

УДК 574.577

## УЧАСТИЕ ПОЛИФЕНОЛОВ В ФОРМИРОВАНИИ ФУНГИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ И УСТОЙЧИВОСТИ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР *HELIANTHUS ANNUUS* L. К ЭКЗОМЕТАБОЛИТАМ ГРИБА *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* L.

© С.М. Зайцева<sup>1\*</sup>, Е.А. Калашникова<sup>1</sup>, Нгуен Тхань Хай<sup>2</sup>, Р.Н. Киракосян<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева, ул. Тимирязевская, 49, Москва, 127550 (Россия), e-mail: smzaytseva@yandex.ru

<sup>2</sup> Вьетнамский национальный аграрный университет, Trau Quy – Gia Lam, Ханой (Вьетнам)

Изучено влияние вторичных метаболитов, в частности полифенолов, на устойчивость каллусных тканей к действию культурального фильтрата *Sclerotinia sclerotiorum*. Исследования проведены на каллусных культурах, полученных из эксплантов, изолированных со стерильных проростков *Helianthus annuus* L. Экспериментально показано, что в условиях *in vitro* содержание растворимых фенольных соединений резко снижается по сравнению с исходными тканями и остается на низком уровне по мере пассирования. Однако при воздействии стрессового фактора (культурального фильтрата гриба *S. sclerotiorum*) накопление полифенолов увеличивается. Установлена прямая корреляция между концентрацией культурального фильтрата гриба *S. sclerotiorum* и биосинтетическим потенциалом каллусных культур. С увеличением концентрации культурального фильтрата увеличивается количественное и качественное содержание полифенолов в каллусной ткани. Специфическими гистохимическими исследованиями показано, что полифенолы в растениях-донорах подсолнечника преимущественно локализируются в покровных, паренхимных и проводящих тканях. В процессе онтогенеза накопление полифенолов в тканях растений увеличивается.

*Ключевые слова:* каллусные культуры, вторичный метаболизм, полифенолы, локализация, стресс, *Helianthus annuus* L., *Sclerotinia sclerotiorum*.

### Введение

Растительный организм является источником не только веществ первичного синтеза, но и разнообразных физиологически активных веществ вторичного происхождения, которые обладают широким спектром действия. К числу наиболее распространенных вторичных метаболитов относятся фенольные соединения (биофлавоноиды) – медиаторы в физиолого-биохимических процессах, определяющие протекторные функции от механических воздействий и патогенов, а также играют роль запасных и физиологически активных веществ [1]. С давних времен известно применение природных полифенолов в традиционной медицине и фармакологии в качестве биологически активных веществ с обширным терапевтическим действием, обусловленным способностью к окислению с образованием хиновых форм, что определяет их гепатопротекторные, нейрорегуляторные, капилляроукрепляющие, желчегонные, противоопухолевые, противомикробные и другие свойства [2].

*Зайцева Светлана Михайловна* – кандидат биологических наук, доцент кафедры биотехнологии, e-mail: smzaytseva@yandex.ru

*Калашникова Елена Анатольевна* – доктор биологических наук, профессор кафедры биотехнологии, e-mail: kalash0407@mail.ru

*Нгуен Тхань Хай* – кандидат биологических наук, доцент кафедры биотехнологии растений, e-mail: nthaicnsh@vnua.edu.vn

*Киракосян Рима Нориковна* – кандидат биологических наук, доцент кафедры биотехнологии, e-mail: mia41291@mail.ru

Перспективным направлением в биотехнологии является сохранение биоразнообразия не только редких лекарственных и исчезающих форм

\* Автор, с которым следует вести переписку.

растений, но и создание генетических банков культур *in vitro*, которые могут быть представлены в виде дифференцированных и дедифференцированных клеток. Как правило, дедифференцированные клетки представлены в виде каллусных или суспензионных культур, которые широко применяются в исследованиях *in vitro* в качестве модельного объекта для изучения вторичного метаболизма [3]. Кроме того, они являются контролируемым источником ценных биологически активных веществ, успешно применяемые в фармацевтической промышленности.

Подсолнечник (*Helianthus annuus* L.) традиционно считается ведущей масличной и кормовой культурой. В отдельных регионах Российской Федерации доля его выращивания занимает более 30% от всех посевных площадей, при этом сохраняя статус одной из самых рентабельных агрокультур. Несмотря на то, что подсолнечник является сельскохозяйственной культурой, его целебные свойства хорошо известны, например, описывается применение в ветеринарии очищенного рафинированного подсолнечного масла как мягчительного и послабляющего средства при закупорке пищевода и зоба у птиц, при хронических заболеваниях печени и желчевыводящих путей, его используют в качестве основы для приготовления различных лекарственных форм. В ветеринарной практике экстракты листьев и цветков подсолнечника, в которых содержатся не только растительные пигменты, но и флавоновые гликозиды, антоцианы, горечи и органические кислоты, рекомендуют в качестве жаропонижающего и улучшающего пищеварение средство [4].

Как известно, у подсолнечника преобладающим продуктом метаболизма являются масла (в семени). Однако для нас вызывает особый интерес изучение именно фенольного метаболизма этих растений с целью определения роли полифенолов в формировании устойчивости клеток и тканей к действию фитопатогена. Биосинтез и накопление вторичных, в том числе и фенольных, соединений отличается пластичностью и зависит не только от видовой принадлежности растений, его органа и стадии онтогенеза, но и от условий произрастания [5]. Одной из опасных болезней подсолнечника является белая гниль (*Sclerotinia sclerotiorum* L.), которая поражает растение в течение всего периода вегетации, от фазы проростка до физиологического созревания.

В связи с тем, что в литературе не так много данных об особенностях образования и локализации вторичных веществ в клеточных культурах растений подсолнечника, особенно в ответ на воздействие стрессового фактора, то целью нашего исследования являлось изучение роли фенольных соединений в формировании фунгицидной активности и устойчивости каллусных культур *H. annuus* L. к экзометаболитам гриба *S. sclerotiorum* L. в условиях *in vitro*.

### Методы и материалы

Объектом исследования служили семена и растения подсолнечника от фазы проростка до физиологического созревания, генотип ВК 580, произрастающие в Московском регионе. Стерилизацию материала проводили в ламинар-боксе (ЛШ-1 Вioком) по методике ранее разработанной на кафедре биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева [6]. В качестве стерилизующего агента применяли 0.1% раствор сулемы ( $HgCl_2$ ). Семена выдерживали в сулеме в течение 10 мин, после чего их промывали в трех порциях стерильной дистиллированной воды, а затем помещали на безгормональную агаризованную питательную среду, содержащую минеральные соли по прописи Мурасига и Скуга (МС) [7]. Семена культивировали в чашках Петри в условиях световой комнаты, где поддерживали температуру 23–25 °С, 16-часовой фотопериод, освещение светодиодными лампами с интенсивностью 6000 лк. С полученных 5-ти суточных проростков изолировали сегменты семядолей и гипокотыля и использовали их для получения первичной и пересадочной каллусной ткани.

Для получения каллусной ткани использовали питательную среду с минеральными солями по прописи МС с добавлением витаминов, сахарозы и фитогормонов в различных концентрациях и соотношениях. рН среды находился в пределах 5.6–5.8. В качестве ауксинов изучали действие нафтилуксусной кислоты (НУК) в концентрации 0.5–3.0 мг/л, а в качестве цитокининов – кинетин – 0.5–3.0 мг/л.

В качестве стрессового фактора использовали культуральный фильтрат (КФ) гриба *S. sclerotiorum*, который получали путем выращивания изолята гриба в 300 мл колбах в 200 мл объеме жидкой питательной среды, содержащей 1/2 минеральных солей по прописи МС с добавлением витаминов, сахарозы 2% на чашке со скоростью вращения 100 об./мин. В каждую колбу вносили по  $10^8$  шт. конидий гриба. Через 28 суток с начала культивирования, суспензию гриба дважды пропускали через стерильную фильтровальную бумагу с последующим автоклавированием с целью получения КФ.

Фитотоксичность КФ и его активность проверяли на различных эксплантах подсолнечника: семенах (при этом оценивали длину корневой системы и надземной части проростков), гипокотильных сегментах, изолированных с 5-суточных проростков, а также на каллусной культуре. Для определения фитотоксичности КФ патогена *S. sclerotiorum* применяли следующие концентрации: для сегментов гипокотилей и каллусной ткани – 5%, 15%, 25%, 35% от конечного объема питательной среды.

Фитотоксичность КФ определяли по методике О.А. Берестецкого [8] и рассчитывали по формуле:

$$T = 100\% - \frac{S_{on}}{S_k} \times 100\% \quad (1)$$

где  $T$  – токсичность КФ;  $l_{on}$  – сумма длин проростков подсолнечника на КФ;  $l_k$  – сумма длин проростков на воде (контроль).

Для извлечения фенольных соединений измельченный растительный материал экстрагировали горячим 96%-ным этанолом. В экстрактах спектрофотометрическим методом определяли содержание суммы растворимых фенольных соединений. Калибровочные кривые строили по рутину [9].

Локализацию определяли гистохимическими методами в свежих резанных препаратах растительного материала: на сумму фенольных соединений материал окрашивали 0.08% раствором реактива Fast Blue, для изучения локализации флаванов использовали реакцию с ванилиновым реактивом в парах соляной кислоты. Препараты просматривали с помощью светового микроскопа KERN OBS 114 [10].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием параметрических критериев Стьюдента и Дункана с помощью программы AGROS (версия 2.11), а также стандартных пакетов программы Windows Excel 2010. На графиках и в таблицах представлены средние арифметические значения.

### Результаты и обсуждения

В отношении многих патогенов, для которых токсины в чистом виде не выделены или недостаточно изучены, при клеточной селекции *in vitro* на устойчивость к ним перспективным направлением является использование культурального фильтрата (КФ) патогенов. Использование его в качестве селективного фактора было экспериментально доказано рядом авторов. Активность КФ зависит от ряда показателей, например, от способа его получения, концентрации в питательной среде, агрессивности штамма изучаемого фитопатогена на разных этапах культивирования [11].

Наши исследования показали, что КФ фитопатогена *S. sclerotiorum* при изучаемых концентрациях оказывает различное токсичное действие на прорастание семян подсолнечника изучаемого генотипа. При использовании неразведенного (100%) КФ токсичность его была максимальной и составила более 50%. Установлена прямо пропорциональная корреляция, которая проявлялась в следующем: с увеличением концентрации КФ и времени культивирования патогена в суспензионной культуре увеличивалась его токсичность.

Известно, что для преодоления растениями абиотических и биотических стрессовых факторов в клетках и тканях усиливается синтез различных соединений вторичной природы [12, 13], в частности, образование полифенолов. При этом фенольные соединения, обладающие высокой биологической активностью, оказывают непосредственное влияние не только на процессы каллусогенеза, но и защищают дедифференцированные клетки при патогенезе [14].



А



Б

Рис. 1. А – Рост чистой культуры гриба *Sclerotinia sclerotiorum* на агаризованной питательной среде и Б – Выращивание гриба *Sclerotinia sclerotiorum* в жидкой питательной среде

Ранее другими исследователями неоднократно было показано, что биосинтетическая активность по отношению к полифенолам в различных органах и тканях растений имеет разную степень интенсивности, которая может изменяться не только в зависимости от метаболического статуса, но и под воздействие факторов окружающей среды [15, 16]. Например, у травянистых растений, как правило, наибольшее накопление полифенолов отмечалось в активно вегетирующих листьях, что, вероятно, связано с их более высокой способностью к образованию таких представителей фенольных соединений, как флаванолы. Высокое содержание полифенолов в надземных органах растений обусловлено присутствием в них хлоропластов, являющиеся основным местом синтеза флаванолов. Для наиболее изученных и широко распространенных флаванолов (кемпферол, кверцетин и мирицетин) помимо антиоксидантных свойств определяют и потенциальную роль в защите от УФ-излучения посредством механизмов УФ-экранирования, что делает их критически важными для адаптации растений [17, 18]. Причем высокий уровень полифенолов, как правило, отмечается в активно растущих проростках *ex vitro*. В условиях *in vitro*, в большинстве случаев, сохраняется тождественная способность органов образовывать биофлавоноиды, но в менее выраженной степени по сравнению с интактными растениями [19]. Экспериментально доказано, что у проростков подсолнечника наименьшее содержание полифенолов отмечалось в гипокотиле. Для наглядных подтверждений приведенных выше доводов нами проведена серия гистохимических исследований по определению локализации полифенолов в вегетативных и генеративных органах подсолнечника и на разных этапах вегетации (рис. 2–4).

Так, в апикальной части корня 5-суточных проростков подсолнечника отмечалась слабая реакция тканей на полифенолы, в то время как в гипокотиле и семядольных листьях окрашивание практически отсутствовало (рис. 2), за исключением незначительной реакции на полифенолы в покровных тканях.

По мере роста и развития биосинтетическая активность полифенолов изменялась. Так, уже в 20-суточных проростках подсолнечника наблюдали образование и локализацию полифенолов в семядольных листьях, в кутикуле и в паренхиме листа. Однако при дальнейшей вегетации яркая реакция окрашивания полифенолов отмечалась не только в кутикуле, но и трихомах первого настоящего листа, практически полностью заполняя их полость. Кроме того, локализация полифенолов была ярко выражена в клеточных стенках и межклетниках покровных и проводящих тканей листа (рис. 3А–Г). Так же интенсивное окрашивание наблюдали и в черешке листа, в покровных и проводящих тканях. Что касается стебля, то образование и локализацию полифенолов наблюдали в клеточных стенках эпидермальных и проводящих тканей, склеренхиме, флоэме и ксилеме (рис. 3Д), а в корнях – в клеточных стенках эндодермы и проводящих тканях (рис. 3Е).

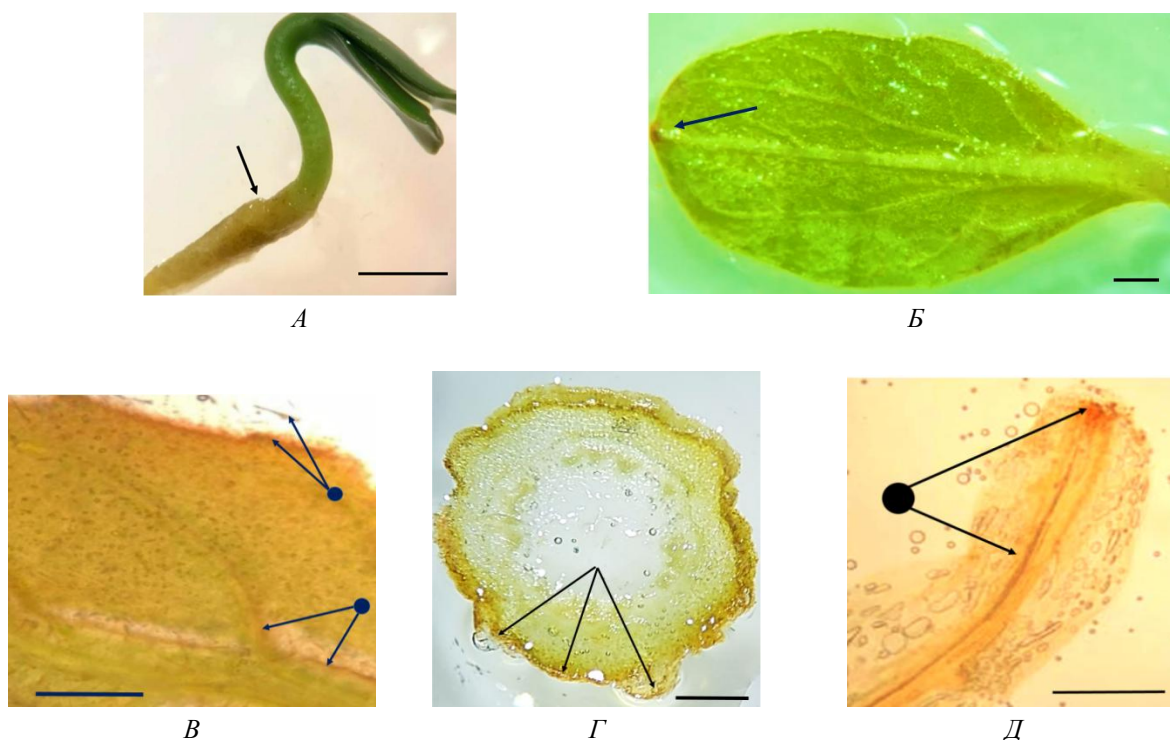


Рис. 2. Локализация полифенолов в проростках подсолнечника (А), листе (Б, В), гипокотиле (Г) и корне (Д). Красно-коричневое окрашивание – реакция с реактивом Fast blue на суммарное содержание растворимых фенольных соединений. Увеличение 3.2×16. Шкала измерений (А – 5 мм, Б–Д – 1 мм)

При переходе растений в фазу физиологического созревания, мы наблюдали изменения по локализации полифенолов в покровных и секреторных тканях. Например, внутри трихом отмечалось крайне редко единичное окрашивание с реактивом Fast blue содержимого клеток, а окрашивание трихом на флаваны полностью отсутствовало. Однако при этом наблюдалось выведение полифенолов на поверхность трихом в виде аморфного вещества и гранулированных агрегатов. Такие трихомы, поверхность которых была «усеяна» скоплениями полифенольных агрегатов, наблюдались в основном на вегетативных органах подсолнечника, в то время как на генеративных органах, трихомы полифенолов не содержали вовсе (рис. 4А–Г).

На заключительной фазе формирования растений – цветение и формирование корзинки – локализация полифенолов отмечалась как в толще цветоложа (расширенном цветоносе) корзинки, так и на границе формирования прицветников отдельных цветков (рис. 4Д–И). Показано, что гистохимическая реакция имела разную степень интенсивности, а характер локализации менялся от очагового до сплошного слоя в нижней части корзинки и в местах развития отдельных цветков. Так, например, наблюдали интенсивное образование полифенолов в завязи, венчике, тычинках, рыльце и лепестках. Для пыльцевых зерен было характерно яркое окрашивание, в том числе и в реакции на флаваны с ванилиновым реактивом. Полифенолы были так же обнаружены в листочках обертки корзинки, преимущественно в мезофилле, проводящих и эпидермальных тканях. В трихомах листочков обертки корзинки полифенолы отсутствовали (рис. 4В–Г).

С целью минимизации физиолого-генотипических особенностей накопления полифенолов каллусными тканями, полученными «по наследству» от исходных эксплантов, в качестве объекта исследования нами был выбран каллус инициированный исключительно из гипокотилия, характеризующийся минимальным накоплением фенольных соединений (рис. 5).

В первой серии экспериментов нами были проведены исследования по изучению изменений количественного содержания фенольных соединений в первичном экспланте – сегментах гипокотилия, при введении в культуру *in vitro*.

По мере культивирования каллусной ткани в стандартных условиях *in vitro*, суммарное содержание растворимых ФС у подсолнечника уже к 1 пассажу резко снижается по сравнению с первичным эксплантом (почти в 4 раза). Так, ко второму пассажу продолжалось некоторое снижение в образовании полифенолов, а к третьему пассажу наблюдалось уже незначительное увеличение. При дальнейшем культивировании каллусной ткани в стандартных условиях уровень фенольных соединений существенно не изменялся и находился в пределах 3.5–5 мг/г сырой массы, что составляло всего лишь 30% от исходного уровня в эксплантах (рис. 6). Снижение биосинтетической активности у каллусных культур в отношении полифенолов неоднократно отмечалось и другими исследователями [20]. В большинстве случаев уровень их накопления существенно ниже, чем в исходных тканях, что может являться следствием изменения цитогенетических и биохимических характеристик клеток в условиях *in vitro*.

Гистохимические исследования каллуса первых пассажей показали единичную локализацию полифенолов в клеточных стенках и межклетниках каллусных тканей подсолнечника. В экспланте, пребывающем в течение 2–3 недель на питательной среде и инициирующем процесс каллусообразования, яркая реакция на полифенолы также наблюдалась в межклетниках и клеточных стенках (рис. 5В–Г).

Известно, что биосинтез полифенолов в присутствии стрессового фактора изменяется [21]. Нами также было отмечено, что при культивировании каллусной ткани в стрессовых условиях (присутствие КФ патогена в различных концентрациях) наблюдается изменение учитываемого показателя, которое проявлялось в увеличении суммарного содержания фенольных соединений в каллусной ткани (рис. 7). Вероятно, культивирование каллусной ткани подсолнечника в стрессовых условиях приводит к «запуску» повышенной программируемой защитной реакции, проявляющейся в увеличении синтеза соединений фенольной природы, как это неоднократно отмечалось в литературе [22]. Присутствие культурального фильтрата патогенна в повышенных концентрациях (25 и 35%) приводило к изменению количественного содержания растворимых фенольных соединений в каллусной ткани в большей степени по сравнению с другими концентрациями КФ (рис. 7). Для генотипа подсолнечника ВК 580 эти изменения находились в пропорциональной зависимости от концентрации стресс-фактора.

Как следует из анализа литературных источников, у растений, обладающих выраженной фунгицидной активностью в комплексе вторичных метаболитов, преобладают такие вещества, как полифенолы, обладающие высокой биологической активностью [23].

Поэтому изучение действия экстрактов растений на токсины патогенов, являются актуальным направлением и может служить косвенным признаком биосинтетической способности растений к образованию вторичных веществ, обладающих не только биологической активностью, но и фунгицидным действием.

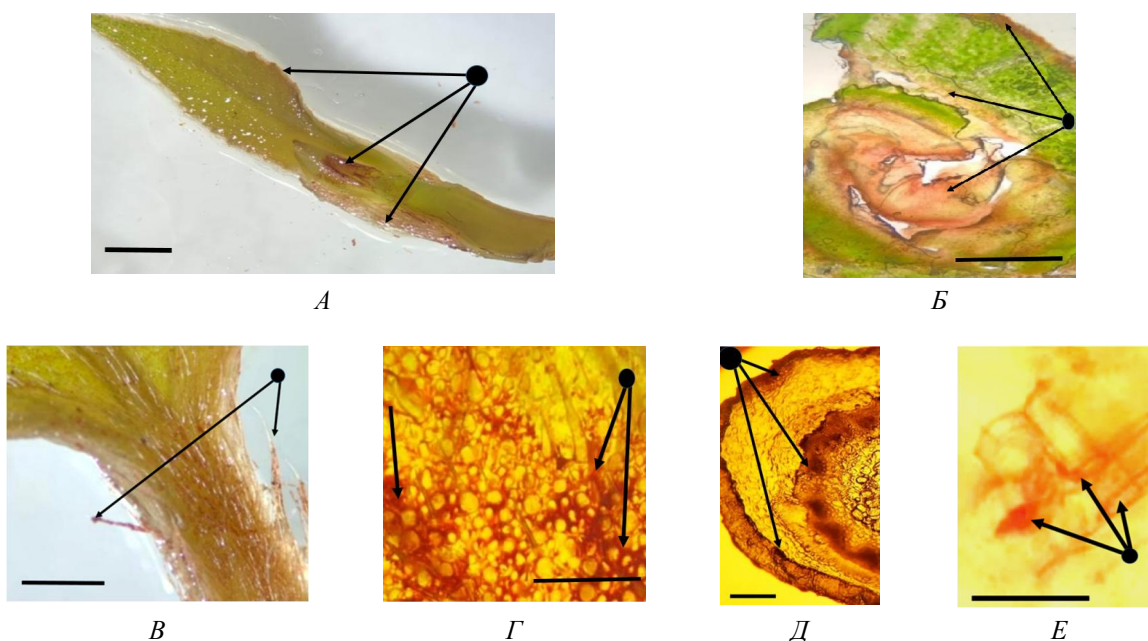


Рис. 3. Локализация фенольных соединений в растениях подсолнечника (формирующаяся почка (продольный – *A* и поперечный срез – *B*), черешок листа (*B*), лист (*G*), стебель (*D*) и корень (*E*)). Красно-коричневое окрашивание – реакция с реактивом Fast blue на суммарное содержание растворимых фенольных соединений (*A–D*) и красно-малиновое окрашивание – реакция на флавоны с ванилиновым реактивом (*E*). Увеличение  $3.2\times 16$ ;  $7\times 20$ . Шкала измерений (*A–D* – 1 мм, *E* – 0.1 мм)

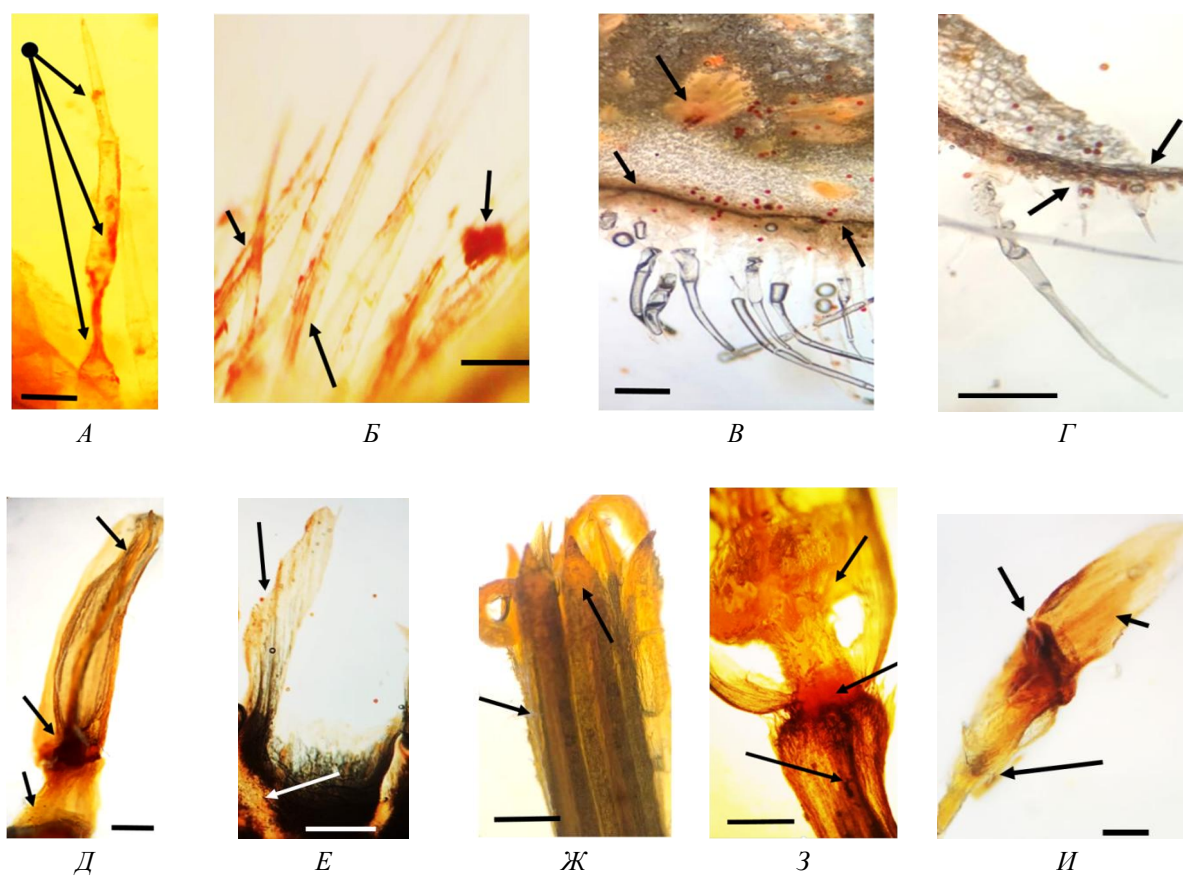


Рис. 4. Локализация фенольных соединений в трихомах (*A–Г*) и цветках подсолнечника (*Д–И*). Красно-малиновое окрашивание – реакция на флавоны с ванилиновым реактивом (*A*) и красно-коричневое окрашивание – реакция с реактивом Fast blue на суммарное содержание растворимых фенольных соединений (*Б–И*). Увеличение  $3.2\times 16$ ;  $7\times 20$ . Шкала измерений (*A–Г* – 0.1 мм, *Д–И* – 1 мм)

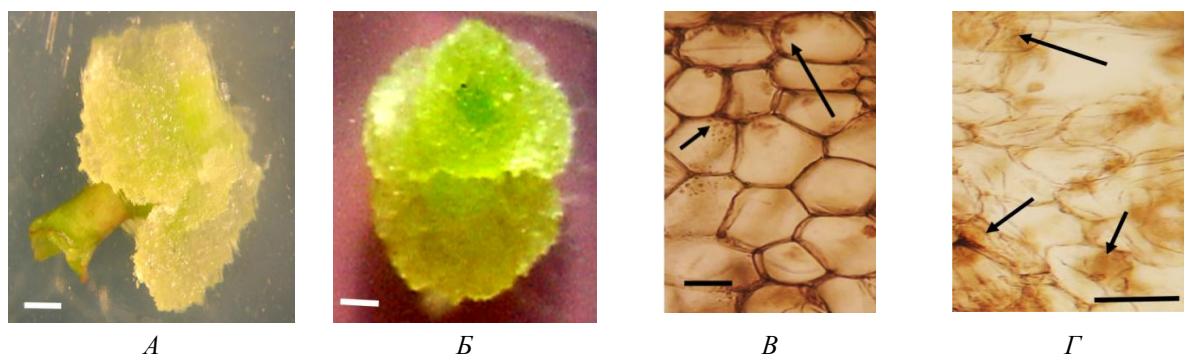
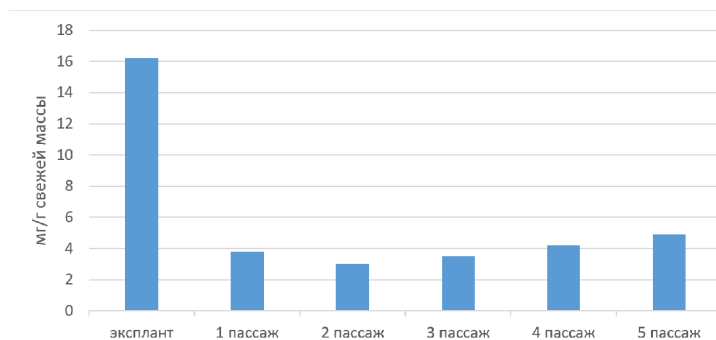


Рис. 5. (А) Инициация каллусной ткани на сегменте гипокотыля подсолнечника и внешний вид каллуса подсолнечника (Б). Локализация растворимых фенольных соединений в экспланте (В) и каллусе первого пассажа подсолнечника краснo-коричневое окрашивание – реакция с реактивом Fast blue на суммарное содержание растворимых фенольных соединений (Б–Г). Увеличение 10 раз; 7×20. Шкала измерений (А, Б – 1 мм, В–Г – 0.1 мм)

Рис. 6. Изменение суммарного содержания растворимых фенольных соединений в экспланте и каллусных культурах подсолнечника генотипа ВК 580 по мере культивирования



Для более детального изучения процессов изменения биосинтеза растворимых фенольных соединений, происходящих в клетках длительно культивируемых каллусных культур на селективных средах в присутствии КФ патогена *Sclerotinia sclerotiorum* и в контрольном варианте, представлялось важным изучение качественного состава фенольного комплекса в процессе культивирования *in vitro*. Для выявления изменений в качественном составе полифенолов, предпочтение было отдано тонкослойной хроматографии, так как она является достаточно простым, мало затратным и информативным методом исследования фенольного комплекса. Исследования проводили в каллусной ткани изучаемого генотипа подсолнечника на I, III и V пассажах цикла клеточной селекции. В качестве селективного фактора нами был выбран вариант присутствия культурального фильтрата патогена в среде в концентрации 15%. Данная концентрация была выбрана не только по причине сохранения активного роста каллусной ткани в этих стрессовых условиях, но и по увеличению биосинтеза полифенолов изучаемого генотипа в ответ на стрессовый фактор. Полученные результаты представлены на рисунке 8.

Как следует из приведенных на рисунках данных, состав фенольного комплекса изменяется в процессе культивирования каллусной ткани опытного и контрольного вариантов.

У контрольного варианта на этапах введения в культуру *in vitro* (I пассаж) наблюдается некоторое обеднение в фенольном спектре. По мере пассирования каллусной ткани и ее адаптации к заданным условиям культивирования мы наблюдали увеличение разнообразия веществ фенольной природы. Причем для изучаемого генотипа ВК 580 было характерно образование 5 новых веществ флавоноловой природы. Надо отметить, что увеличение разнообразия фенольного комплекса было отмечено уже на I пассаже.

При культивировании каллусной ткани в стрессовых условиях нами было показано изменение в разнообразии фенольного комплекса (рис. 8Б). Наблюдали обогащение спектра синтезируемых веществ фенольной природы за счет биосинтеза *de novo* соединений фенилпропаноидного и флавоноидного ряда. Так, для генотипа ВК 580 к третьему пассажу выращивания на среде со стрессовым фактором отмечалось наличие 8 соединений фенольной природы, против 6 в контрольном образце. Можно предположить, что такие изменения в качественном составе связаны и с количественным содержанием полифенолов (рис. 7). Все это свидетельствует о том, что при культивировании каллусной ткани в стрессовых условиях изменяется синтез фенольных соединений, который приводит к появлению более разнообразного фенольного комплекса.

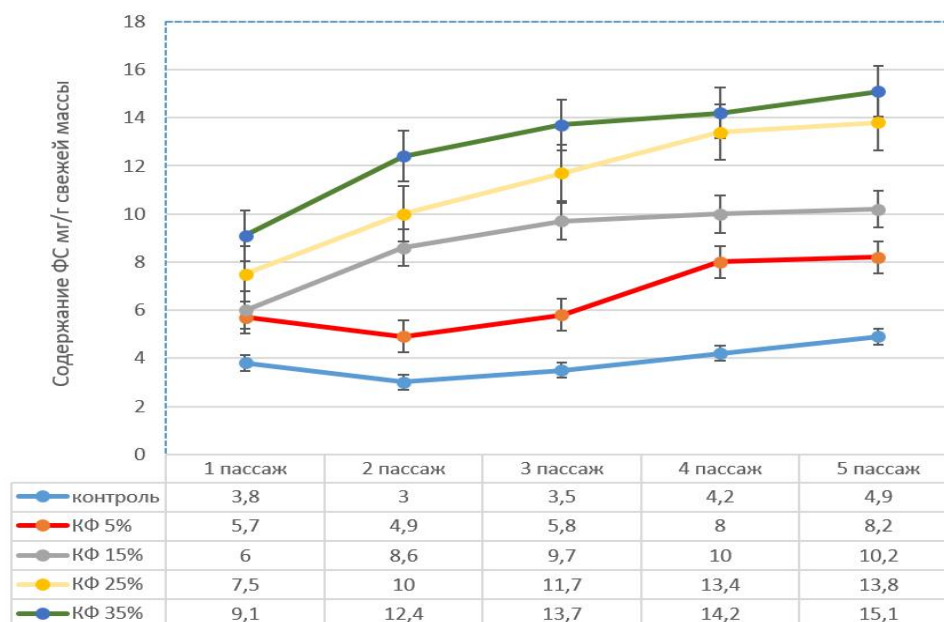


Рис. 7. Изменение суммарного содержания растворимых фенольных соединений в каллусных тканях подсолнечника генотипа ВК 580 при длительном культивировании в присутствии культурального фильтрата гриба *Sclerotinia sclerotiorum* различной концентрации

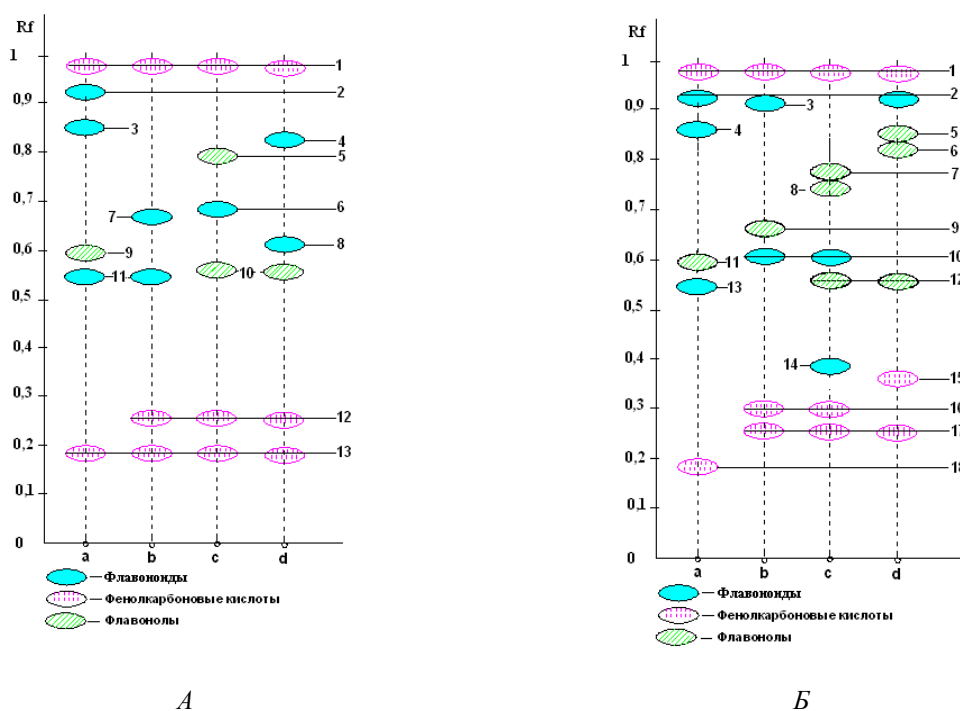


Рис. 8. Схема хроматограммы этанольных экстрактов фенольных соединений различных тканей подсолнечника генотипа ВК 580: А – контроль, Б – присутствие КФ патогена *Sclerotinia sclerotiorum* в питательной среде в концентрации 15% (а – гипокотиль, б – I пассаж, с – III пассаж, d – V пассаж)

На основе изложенного выше можно заключить, что каллусные культуры, инициированные из тканей растений, обладающих минимальной способностью к биосинтезу фенольных соединений, что подтверждается и гистохимическими исследованиями, в ответ на стрессовый фактор представленный высокоагрессивным штаммом гриба *Sclerotinia sclerotiorum* проявляют увеличение биосинтетической способности, коррелирующей с концентрацией культурального фильтрата гриба. Из полученных результатов следует, что присутствие культурального фильтрата патогена в среде приводит к изменению состава фенольных соединений



в сторону его увеличения по сравнению с контрольным вариантом, что подтверждается биохимическими исследованиями количественного и качественного содержания полифенолов. Поэтому изучение физиолого-биохимического статуса культур является важнейшей и первостепенной задачей.

Несомненно, все это имеет важное практическое значение, свидетельствующее о роли полифенолов как защитного фактора, так и в формировании фунгицидной активности растительных экстрактов, применяемых в качестве потенциальных источников ценных биологически активных веществ для фарминдустрии [24]. Наши исследования показали, что вторичные метаболиты не только способствуют преодолению ингибирующего эффекта патогенов на рост и развитие каллусных культур, но и могут быть стимуляторами различных морфофизиологических процессов, о чем свидетельствует ряд литературных источников [25, 26].

### Список литературы

1. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и их роль в жизни растения: 56 Тимирязевское чтения. М., 1996. 45 с.
2. Алексеева Г.М. и др. Фармакогнозия. Лекарственное сырье растительного и животного происхождения. СПб., 2013. 378 с.
3. Носов А.М. Использование клеточных технологий для промышленного получения биологически активных веществ растительного происхождения // Биотехнология. 2010. №5. С. 8–28. DOI: 10.1134/S000368381107009X.
4. Журба О.В., Дмитриев М.Я. Лекарственные, ядовитые и вредные растения. М., 2002. 512 с.
5. Brossa R., Casals I., Pintó-Marijuan M., Fleck I. Leaf Flavonoid content in *Quercus ilex* L. resprouts and its seasonal variation // Trees. 2009. Vol. 23. N2. Pp. 401–408. DOI: 10.1007/s00468-008-0289-5.
6. Калашникова Е.А., Чердниченко М.Ю., Зайцева С.М., Кочиева Е.З., Халилуев М.Р., Карсункина Н.П. Лабораторный практикум по биотехнологии растений: учебное пособие. М., 2019. 240 с.
7. Нгуен Тхань Хай. Экспериментальный морфогенез в культуре изолированных клеток и тканей подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) // Известия ТСХА. 2007. №2. С. 116–124.
8. Берестецкий О.А. Изучение фитотоксических свойств микроскопических грибов. Методы экспериментальной микологии. Киев, 1982. С. 321–333.
9. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и методы их исследования. Биохимические методы в физиологии растений. М., 1971. С. 185–197.
10. Soukupova J., Cvikrova M., Albrechtova J., Rock B.N., Eder J. Histochemical and biochemical approaches to the study of phenolic compounds and peroxidases in needles of norway spruce (*Picea abies*) // New Phytol. 2000. Vol. 146. Pp. 403–414. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2000.00666.x.
11. Арасланова Н.М., Ивебор М.В., Саукова С.Л., Антонова Т.С. Влияние культуральных фильтратов изолятов грибов рода *Alternaria*, *Bipolaris*, *Ulocladium* на прорастание семян и развитие проростков подсолнечника // Масличные культуры. 2014. №1 (157–158). С. 124–129.
12. Zagoskina N.V., Goncharuk E.A., Alyavina A.K. Effect of cadmium on the phenolic compounds formation in the callus cultures derived from various organs of the tea plant // Russian Journal of Plant Physiology. 2007. Vol. 54. Pp. 237–243. DOI: 10.1134/S1021443707020124.
13. Hassan S., Mathesius U. The role of flavonoids in root – rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant–microbe interactions // Journal of experimental botany. 2012. Vol. 63. N9. Pp. 3429–3444. DOI: 10.1093/jeb/err430.
14. Schneider-Müller S., Kurosaki F., Nishi A. Role of salicylic acid and intracellular Ca<sup>2+</sup> in the induction of chitinase activity in carrot suspension culture // Physiological and Molecular Plant Pathology. 1994. Vol. 45. N2. Pp. 101–109. DOI: 10.1016/S0885-5765(05)80069-4.
15. Калашникова Е.А., Зайцева С.М., Доан Тху Тхуи, Киракосян Р.Н. О влиянии регуляторов роста на способность микроклонов лекарственного растения *Dioscorea caucasia* Lypsky к образованию и локализации полифенолов // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. 2018. №2(38). С. 39–45.
16. Калашникова Е.А., Зайцева С.М., Доан Тху Тхуи, Киракосян Р.Н. Влияние регуляторов роста на морфогенетическую активность эксплантов *Dioscorea nipponica* Makino и образование полифенолов // Международный научно-исследовательский журнал. 2020. №6-2 (96). С. 6–11. DOI: 10.23670/IRJ.2020.96.6.039.
17. Запрометов М.Н., Николаева Т.Н. Способность изолированных хлоропластов из листьев фасоли осуществлять биосинтез фенольных соединений // Физиология растений. 2003. Т. 50. №5. С. 699–702.
18. Jus Laoué J., Fernandez C., Ormeño E. Plant flavonoids in mediterranean species: a focus on flavonols as protective metabolites under climate stress // Plants. 2022. Vol. 11. N2. P. 172. DOI: 10.3390/plants11020172.
19. Калашникова Е.А., Зайцева С.М., Доан Тху Тхуи, Киракосян Р.Н. Локализация фенольных соединений в клетках и тканях лекарственных растений (*Dioscorea caucasia* Lypsky, *Euonymus nana* Bieb., *Aristolochia manshuriensis* Kom), культивируемых в условиях *in vitro* // Вопросы биологической, фармацевтической и медицинской химии. 2019. Т. 22. №5. С. 48–54. DOI: 10.29296/25877313-2019-05-09.
20. Дубравина Г.А., Зайцева С.М., Загоскина Н.В. Изменения в образовании и локализации фенольных соединений при дедифференциации тканей тисса ягодного и тисса канадского в условиях *in vitro* // Физиология растений. 2005. Т. 52. №5. С. 755–762. DOI: 10.1007/s11183-005-0100-z.

21. Sharma A., Shahzad B., Rehman A., Bhardwaj R., Landi M., Zheng B. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress // *Molecules*. 2019. Vol. 24. N13. Article 2452. DOI: 10.3390/molecules24132452.
22. Lattanzio V., Lattanzino V.M.T., Cardinali A. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects // *Phytochemistry: Advances in research*. 2006. Vol. 661. N2. Pp. 23–67.
23. Марьин А.А., Коломиец Н.Э. Лекарственные растения и биологически активные вещества противогрибкового действия // *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2017. Т. 2. №4. С. 45–55. DOI: 10.23946/2500-0764-2017-2-4-45-55.
24. Куркин В.А. Фенилпропаноиды – перспективные природные биологически активные соединения. Самара, 1996. С. 31–37.
25. Zengqi L., Tiexin T., Shejian L., Xiping N., Mei B., Hong W. The synthesis and storage of phenolic compounds in the root and rhizome of *Echinacea purpurea* // *American journal of Plant Sciences*. 2012. Vol. 2012. Pp. 551–558. DOI: 10.4236/ajps.2012.34066.
26. Brunetti C., Fini A., Sebastiani F., Gori A., Tattini M. Modulation of phytohormone signaling: a primary function of flavonoids in plant–environment interactions // *Frontiers in Plant science*. 2018. Vol. 9. Article 1042. DOI: 10.3389/fpls.2018.01042.

Поступила в редакцию 24 февраля 2022 г.

После переработки 23 января 2023 г.

Принята к публикации 11 марта 2023 г.

**Для цитирования:** Зайцева С.М., Калашникова Е.А., Нгуен Тхань Хай, Киракосян Р.Н. Участие полифенолов в формировании фунгицидной активности и устойчивости каллусных культур *Helianthus annuus* L. к экзометаболитам гриба *Sclerotinia sclerotiorum* L. // *Химия растительного сырья*. 2023. №2. С. 289–299. DOI: 10.14258/jcrpm.20230211025.

Zaytseva S.M.<sup>1\*</sup>, Kalashnikova E.A.<sup>1</sup>, Nguyen Thanh Hai<sup>2</sup>, Kirakosyan R.N.<sup>1</sup> PARTICIPATION OF POLYPHENOLS IN THE FORMATION OF FUNGICIDAL ACTIVITY AND RESISTANCE OF *HELIANTHUS ANNUUS* L. CALLUS CULTURES TO EXOMETABOLITES OF THE FUNGUS *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* L.

<sup>1</sup> Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, ul. Timiryazevskaya, 49, Moscow, 127550 (Russia), e-mail: smzaytseva@yandex.ru

<sup>2</sup> Vietnam National University of Agriculture, Trau Quy – Gia Lam, Hanoi (Vietnam)

The effect of secondary metabolites, in particular polyphenols, on the resistance of callus tissues to the action of *Sclerotinia sclerotiorum* culture filtrate was studied. The studies were carried out on callus cultures obtained from explants isolated from sterile seedlings of *Helianthus annuus* L. It has been experimentally shown that under in vitro conditions, the content of soluble phenolic compounds sharply decreases in comparison with the original tissues and remains at a low level as it passes. However, when exposed to a stress factor (cultural filtrate of the fungus *S. sclerotiorum*), the accumulation of polyphenols increases. A direct correlation was established between the concentration of the cultural filtrate of the fungus *S. sclerotiorum* and the biosynthetic potential of callus cultures. With an increase in the concentration of cultural filtrate, the quantitative and qualitative content of polyphenols in the callus tissue increases. Specific histochemical studies. It is shown that polyphenols in sunflower plants are mainly localized in the integumentary, parenchymal and conductive tissues. As plants grow, the accumulation of polyphenols in plant tissues increases.

**Keywords:** callus cultures, secondary metabolism, polyphenols, localization, stress, *Helianthus annuus* L., *Sclerotinia sclerotiorum*.

---

\* Corresponding author.

## References

1. Zaprometov M.N. *Fenol'nyye soyedineniya i ikh rol' v zhizni rasteniy: 56 Timiryazevskoye chteniya*. [Phenolic compounds and their role in plant life: 56 Timiryazev Readings]. Moscow, 1996, 45 p. (in Russ.).
2. Alekseyeva G.M. et al. *Farmakognoziya. Lekarstvennoye syr'ye rastitel'nogo i zhivotnogo proiskhozhdeniya. Pharmacognosy*. [Medicinal raw materials of plant and animal origin]. St. Petersburg, 2013, p. 378. (in Russ.).
3. Nosov A.M. *Biotehnologiya*, 2010, no. 5, pp. 8–28. DOI: 10.1134/S000368381107009X. (in Russ.).
4. Zhurba O.V., Dmitriyev M.Ya. *Lekarstvennyye, yadovityye i vrednyye rasteniya*. [Medicinal, poisonous and harmful plants]. Moscow, 2002, 512 p. (in Russ.).
5. Brossa R., Casals I., Pintó-Marijuan M., Fleck I. *Trees*, 2009, vol. 23, no. 2, pp. 401–408. DOI: 10.1007/s00468-008-0289-5.
6. Kalashnikova Ye.A., Cherednichenko M.Yu., Zaytseva S.M., Kochiyeva Ye.Z., Khaliluyev M.R., Karsunkina N.P. *Laboratornyy praktikum po biotekhnologii rasteniy (uchebnoye posobiye)*. [Laboratory workshop on plant biotechnology (textbook)]. Moscow, 2019, 240 p. (in Russ.).
7. Nguyen Thanh Hai. *Izvestiya TSKHA*, 2007, no. 2, pp. 116–124. (in Russ.).
8. Berestetskiy O.A. *Izucheniye fitotoksicheskikh svoystv mikroskopicheskikh gribov. Metody eksperimental'noy mikologii*. [Study of phytotoxic properties of microscopic fungi. Methods of experimental mycology]. Kyiv, 1982, pp. 321–333. (in Russ.).
9. Zaprometov M.N. *Fenol'nyye soyedineniya i metody ikh issledovaniya. Biokhimicheskiye metody v fiziologii rasteniy*. [Phenolic compounds and methods for their study. Biochemical methods in plant physiology]. Moscow, 1971, pp. 185–197. (in Russ.).
10. Soukupova J., Cvikrova M., Albrechtova J., Rock B.N., Eder J. *New Phytol.*, 2000, vol. 146, pp. 403–414. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2000.00666.x.
11. Araslanova N.M., Ivebor M.V., Saukova S.L., Antonova T.S. *Maslichnyye kul'tury*, 2014, no. 1 (157–158), pp. 124–129. (in Russ.).
12. Zagoskina N.V., Goncharuk E.A., Alyavina A.K. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2007, vol. 54, pp. 237–243. DOI: 10.1134/S1021443707020124.
13. Hassan S., Mathesius U. *Journal of experimental botany*, 2012, vol. 63, no. 9, pp. 3429–3444. DOI: 10.1093/jeb/err430.
14. Schneider-Müller S., Kurosaki F., Nishi A. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1994, vol. 45, no. 2, pp. 101–109. DOI: 10.1016/S0885-5765(05)80069-4.
15. Kalashnikova Ye.A., Zaytseva S.M., Doan Thu Thuy, Kirakosyan R.N. *Aktual'nyye voprosy veterinarnoy biologii*, 2018, no. 2(38), pp. 39–45. (in Russ.).
16. Kalashnikova Ye.A., Zaytseva S.M., Doan Thu Thuy, Kirakosyan R.N. *Mezhdunarodnyy nauchno-issledovatel'skiy zhurnal*, 2020, no. 6–2(96), pp. 6–11. DOI: 10.23670/IRJ.2020.96.6.039. (in Russ.).
17. Zaprometov M.N., Nikolayeva T.N. *Fiziologiya rasteniy*, 2003, vol. 50, no. 5, pp. 699–702. (in Russ.).
18. Jus Laoué J., Fernandez C., Ormeño E. *Plants*, 2022, vol. 11, no. 2, p. 172. DOI: 10.3390/plants11020172.
19. Kalashnikova Ye.A., Zaytseva S.M., Doan Thu Thuy, Kirakosyan R.N. *Voprosy biologicheskoy, farmatsevticheskoy i meditsinskoy khimii*, 2019, vol. 22, no. 5, pp. 48–54. DOI: 10.29296/25877313-2019-05-09. (in Russ.).
20. Dubravina G.A., Zaytseva S.M., Zagoskina N.V. *Fiziologiya rasteniy*, 2005, vol. 52, no. 5, pp. 755–762. DOI: 10.1007/s11183-005-0100-z. (in Russ.).
21. Sharma A., Shahzad B., Rehman A., Bhardwaj R., Landi M., Zheng B. *Molecules*, 2019, vol. 24, no. 13, article 2452. DOI: 10.3390/molecules24132452.
22. Lattanzio V., Lattanzio V.M.T., Cardinali A. *Phytochemistry: Advances in research*, 2006, vol. 661, no. 2, pp. 23–67.
23. Mar'in A.A., Kolomiyets N.E. *Fundamental'naya i klinicheskaya meditsina*, 2017, vol. 2, no. 4, pp. 45–55. DOI: 10.23946/2500-0764-2017-2-4-45-55. (in Russ.).
24. Kurkin V.A. *Fenilpropanoidy – perspektivnyye prirodnyye biologicheski aktivnyye soyedineniya*. [Phenylpropanoids are promising natural biologically active compounds]. Samara, 1996, pp. 31–37. (in Russ.).
25. Zengqi L., Tiexin T., Shejian L., Xiping N., Mei B., Hong W. *American journal of Plant Sciences*, 2012, vol. 2012, pp. 551–558. DOI: 10.4236/ajps.2012.34066.
26. Brunetti C., Fini A., Sebastiani F., Gori A., Tattini M. *Frontiers in Plant science*, 2018, vol. 9, article 1042. DOI: 10.3389/fpls.2018.01042.

Received February 24, 2022

Revised January 23, 2023

Accepted March 11, 2023

**For citing:** Zaytseva S.M., Kalashnikova E.A., Nguyen Thanh Hai, Kirakosyan R.N. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2023, no. 2, pp. 289–299. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprn.20230211025.

