

УДК 581.19

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ТКАНЯХ И КЛЕТКАХ ГОЛУБИКИ ЩИТКОВОЙ *VACCINIUM CORYMBOSUM* L. В УСЛОВИЯХ *IN VIVO* И *IN VITRO*

© **Е.В. Березина*, Д.А. Рыбин, А.А. Сухова, А.А. Сёмин, И.В. Мишукова, А.А. Брилкина**

**Национальный исследовательский Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского, пр. Гагарина, 23, Нижний Новгород,
603022, Россия, berezina.kat@gmail.com**

В листьях, ягодах, каллусах и культурах суспензионных клеток голубики щитковой *Vaccinium corymbosum* L. фотометрически определено содержание фенольных соединений, а именно растворимых фенольных соединений, флавоноидов, флаванов и проантоцианидинов. Показано, что каллусные и суспензионные культуры голубики щитковой сохраняют способность к накоплению фенольных соединений, сопоставимую с листьями и ягодами данного вида растения. В частности, содержание растворимых фенольных соединений в листьях составляет около 270 мг/г сухой массы, в ягодах – 70 мг/г сухой массы, в каллусных культурах – 35–102 мг/г сухой массы, в культурах суспензионных клеток – 125–150 мг/г сухой массы в зависимости от происхождения культур (от типа экспланта). В фенольном комплексе каллусов и суспензионных клеток, как и листьев, преобладают флавоноиды (25–146 мг/г сухой массы и 180 мг/г сухой массы соответственно), сохраняется синтез флаванов и проантоцианидинов; при этом в суспензионных клетках, инициированных из каллусов листового происхождения, накопление флаванов и проантоцианидинов даже усиливается. Проведенное исследование указывает на то, что культуры суспензионных клеток голубики щитковой, инициированные из каллусов листового происхождения, могут быть альтернативой растениям открытого грунта для получения хозяйственно ценных групп фенольных соединений, характерных для метаболизма вересковых растений.

Ключевые слова: *Vaccinium corymbosum*, листья, ягоды, каллусы, культура суспензионных клеток, фенольные соединения.

Сокращения и обозначения: 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; БАП – бензиламинопурин; РФС – растворимые фенольные соединения; WPM – Woody Plant Medium.

Для цитирования: Березина Е.В., Рыбин Д.А., Сухова А.А., Сёмин А.А., Мишукова И.В., Брилкина А.А. Сравнительный анализ содержания фенольных соединений в тканях и клетках голубики щитковой *Vaccinium corymbosum* L. в условиях *in vivo* и *in vitro* // Химия растительного сырья. 2024. №3. С. 129–137. DOI: 10.14258/jcprm.20240313979.

Введение

Растения синтезируют разнообразные фенольные соединения, среди которых наибольшей биологической активностью обладают флавоноиды и их олигомеры проантоцианидины [1], являющиеся высокоэффективными антиоксидантами [2]. Растительные фенольные соединения активно используются в пищевой, косметической и медицинской промышленности в качестве красителей и антиоксидантов, и потребность в них постоянно растет [2, 3]. Традиционно для промышленного получения фенольных соединений используют дикорастущие растения или растения, произрастающие на плантациях [4]. Однако использование такого сырья сопряжено с определенными трудностями, прежде всего, с сезонностью развития растений, со значительным влиянием биотических и абиотических факторов среды на содержание целевых метаболитов, с низким выходом метаболитов из-за их деградации при длительном хранении сырья и в случае многостадийной экстракции [5, 6], а также с ограниченностью доступа к целому ряду видов растений (редкие/исчезающие/чрезмерно эксплуатируемые виды).

Культивируемые в условиях *in vitro* каллусные и суспензионные клетки растений могут быть альтернативой природному растительному сырью для промышленного получения ценных метаболитов [7, 8]. Достоинства таких *in vitro* культур четко сформулированы в ряде обзоров этого столетия. К ним относятся

* Автор, с которым следует вести переписку.

высокая экономическая эффективность, более короткие и гибкие производственные циклы, наличие постоянно возобновляемого сырья и отсутствие влияния природных факторов, возможность с помощью методов метаболической инженерии получать штаммы-сверхпродуценты с контролируемым составом и количеством производимых метаболитов [9, 10]. Одним из наиболее известных примеров биотехнологических производств с использованием культур суспензионных клеток растений является получение препаратов на основе таксола (дитерпеноида с противоопухолевой активностью) из клеток тисса и красителя фенольной природы шиконина из воробейника [10, 11]. Кроме того, в промышленных масштабах с помощью культур клеток реализовано получение таких фенольных соединений, как подофиллотоксин, розмариновая кислота, ванилин, антоцианы [11].

Растения-представители семейства Вересковые (*Ericaceae* Juss.) являются очень эффективными продуцентами фенольных соединений. Их листья и ягоды особенно богаты флавоноидами (флавонолами и флаванами, в т.ч. катехинами), олигомерами катехинов – проантоцианидинами, фенольными кислотами (производными бензойной и гидроксикоричной (фенилпропановой) кислот) и полимерными фенольными соединениями [12–20]. Среди вересковых растений значительное внимание исследователей привлекает фенольный комплекс ягод и листьев голубики щитковой *Vaccinium corymbosum* L. [12, 15–17, 19]. При этом работ по исследованию фенольного метаболизма каллусов и особенно суспензионных клеток вересковых растений немного. В частности, для голубики щитковой имеются сведения о каллусных культурах, инициированных из листьев и стеблей растений открытого грунта [21], а также из листьев, стеблей и корней стерильных проростков [22]. Показано, что каллусы, инициированные из корней, накапливают больше антоцианов, а каллусы, инициированные из листьев, характеризуются более разнообразным качественным составом антоцианов [22]. Каллусные культуры, инициированные из ягод, и культуры суспензионных клеток голубики щитковой в научной литературе практически не описаны.

В настоящей работе проведен сравнительный анализ содержания фенольных соединений в листьях и ягодах растений открытого грунта, а также в инициированных из них каллусах и в суспензионных клетках голубики щитковой *V. corymbosum* L.

Материалы и методы

В работе использовали растения голубики щитковой (*Vaccinium corymbosum* L., форма 34; листья и ягоды), собранные в августе 2022 г. в период плодоношения на территории Ботанического сада (56°15' с.ш., 44°20' в.д.) ННГУ им. Н.И. Лобачевского. Ботанический сад находится в зоне хвойно-широколиственных лесов на правом берегу реки Оки; высота над уровнем моря – 182 м; климат умеренно континентальный; почвы серые лесные, по механическому составу – средние суглинки [18].

Из собранных листьев и ягод голубики щитковой инициировали каллусы и далее культуры суспензионных клеток. Листья и ягоды стерилизовали путем последовательной обработки растворами 4% серебро-медина (БИО-комплекс, Россия) (30 мин), 80% этанола (5 мин), 7% гипохлорита натрия (5 мин), 15% пероксида водорода (5 мин) и дважды промывали в стерильной дистиллированной воде (по 5 мин). Инициацию каллусов проводили на листовых эксплантах размером 0.7 × 0.7 см и на ягодных эксплантах объемом 0.06 см³ (четверть ягоды без семян) в течение 8 недель на агаризованной питательной среде Woody Plant Medium (WPM) [23], содержащей 30 г/л сахарозы, 0.5 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и 0.5 мг/л бензиламинопурина (БАП). Далее через два цикла культивирования (пассажа) по 4 недели из каллусов листового и ягодного происхождения инициировали культуры суспензионных клеток в такой же питательной среде, но без добавления агара, для чего каллусы массой около 1 г переносили в колбы на 100 мл, содержащие 30 мл питательной среды, и культивировали на орбитальном шейкере при скорости вращения 120 об/мин с радиусом вращения 20 мм. Длительность пассажей составляла 30 дней, соотношение инокулят : свежая среда при пересадке культуры 1 : 2, жизнеспособность клеток по тесту с красителем синий Эванса 70–80%. Культивирование каллусов и суспензионных клеток проводили в темноте при температуре 25 °С, влажности воздуха 60–70%.

В свежесобранных листьях и ягодах, в каллусах (5 пассаж) и суспензионных клетках (5 пассаж) голубики щитковой проводили определение содержания растворимых фенольных соединений (РФС), флавоноидов, флаванов и проантоцианидинов. Исследуемый материал фиксировали кипящим 80% раствором этанола в течение 10 мин, соотношение растительный материал : этанол составляло 1 г к 10 мл [18]. В полу-

ченных экстрактах определяли содержание РФС по методике М.Н. Запрометова [24], флавоноидов – по методике G. Gunes, R.H. Liu и C.B. Watkins [25], флаванов – по методике М.Н. Запрометова [24], проантоцианидинов – по методике О.М. Хишовой и Г.Н. Бузук [26].

Для определения содержания РФС к 0.5 мл экстракта добавляли 8.55 мл воды, 0.5 мл реактива Фолина-Денис и через 3 мин – 1 мл 7% раствора Na_2CO_3 . Через 1 ч измеряли оптическую плотность при длине волны 725 нм.

Для определения содержания флавоноидов к 0.5 мл экстракта добавляли 5 мл воды, 0.3 мл 5% раствора NaNO_2 , через 5 мин – 0.3 мл 10% раствора AlCl_3 , через 6 мин – 2 мл 1 М раствора NaOH и водой доводили объем до 10 мл. Оптическую плотность измеряли при длине волны 510 нм.

Для определения содержания флаванов к 0.4 мл экстракта добавляли 2 мл ванилинового реактива (1% раствор ванилина в $\text{HCl}_{\text{конц.}}$). Через 15 мин измеряли оптическую плотность при длине волны 510 нм.

Для определения содержания проантоцианидинов к 0.4 мл экстракта добавляли 2.4 мл бутанольного реактива (бутанол : $\text{HCl}_{\text{конц.}}$ = 19 : 1) и 0.12 мл Fe(III) -реактива (0.5 г соли Мора в 25 мл 2 М раствора HCl). Смесь нагревали на водяной бане при 95 °С в течение 40 мин, затем охлаждали и измеряли оптическую плотность при длине волны 550 нм.

Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ Спектр, Россия). Содержание РФС и флавоноидов определяли с использованием градуировочных зависимостей, построенных по раствору рутин (Acros Organics, Бельгия), содержание флаванов определяли с использованием градуировочной зависимости, построенной по раствору катехина (Sigma, США), содержание проантоцианидинов рассчитывали по формуле:

$$C = D \cdot \frac{Mr}{\varepsilon \cdot l} \cdot F,$$

где D – оптическая плотность; Mr – молярная масса цианидина (287 г/моль); ε – коэффициент молярной экстинкции цианидина ($34700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) [27]; l – длина оптического пути; F – разведение.

Для возможности корректного сравнения содержания фенольных соединений в листьях, ягодах, каллусах и суспензионных клетках голубики щитковой результаты выражали в мг/г сухой массы. Для этого листья и ягоды высушивали в термостате при температуре 85 °С, каллусы и суспензионные клетки – при 60 °С до постоянной сухой массы. Суспензионные клетки перед взвешиванием отфильтровывали на воронке Бюхнера через бумажный фильтр под вакуумом. Определение содержания сырой и сухой массы проводили в 3–4 биологических повторностях.

На графиках представлены средние арифметические значения из не менее трех биологических повторностей и их стандартные отклонения. В каждой биологической повторности не менее чем 5 листьев, 15 ягод, 5 каллусов, 3 колбы с суспензионными клетками; каждая повторность выполнена в трех аналитических повторностях. Статистическую обработку результатов производили с помощью программы Microsoft Excel 2016.

Результаты и их обсуждение

В листьях, ягодах, каллусах и инициированных из них культурах суспензионных клеток голубики щитковой нами было определено суммарное содержание растворимых фенольных соединений (РФС) – фенольных соединений, экстрагируемых раствором этанола; флавоноидов – наиболее многочисленной группы фенольных соединений; флаванов – наиболее восстановленных представителей флавоноидов и включающих в себя катехины; проантоцианидинов – олигомеров катехинов. Выявлено, что все исследованные объекты накапливали значительное количество фенольных соединений. В частности, листья голубики щитковой накапливали РФС около 270 мг/г сухой массы, ягоды – 70 мг/г сухой массы (рис. 1).

В фенольном комплексе листьев голубики щитковой флавоноиды преобладали: их содержание достигало 180 мг/г сухой массы. Содержание флаванов в листьях составляло 32 мг/г сухой массы, проантоцианидинов – 85 мг/г сухой массы. В ягодах содержание этих соединений было меньше, чем в листьях, в 5–9 раз (особенно флавоноидов).

В каллусах, инициированных из листьев на питательной среде WPM с добавлением 2,4-Д и БАП в концентрации по 0.5 мг/л, также отмечен достаточно высокий уровень фенольных соединений: содержание РФС составляло 102 мг/г сухой массы, флавоноидов – 80 мг/г сухой массы, флаванов – 28 мг/г сухой массы,

проантоцианидинов – 43 мг/г сухой массы (рис. 2а). В каллусах, инициированных из ягод на такой же питательной среде, содержание всех групп фенольных соединений было в три раза ниже (рис. 2б).

Суспензионные клетки голубики щитковой, культивируемые в жидкой питательной среде WPM, накапливали фенольные соединения в 1.5–4 раза больше, чем каллусы, из которых они были инициированы (рис. 2, 3). Как и в листьях и в инициированных из них каллусах, флавоноиды в фенольном комплексе суспензионных клеток преобладали. При этом суспензионные клетки, инициированные из каллусов листового происхождения, накапливали в 1.2–3 раза больше фенольных соединений, чем суспензионные клетки, инициированные из каллусов ягодного происхождения, особенно флаванов и проантоцианидинов.

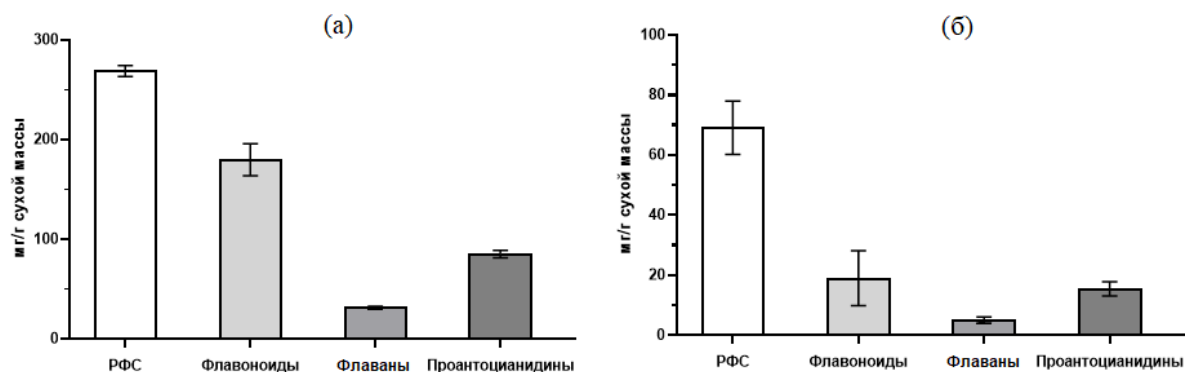


Рис. 1. Содержание фенольных соединений в листьях (а) и ягодах (б) голубики щитковой *V. corymbosum*

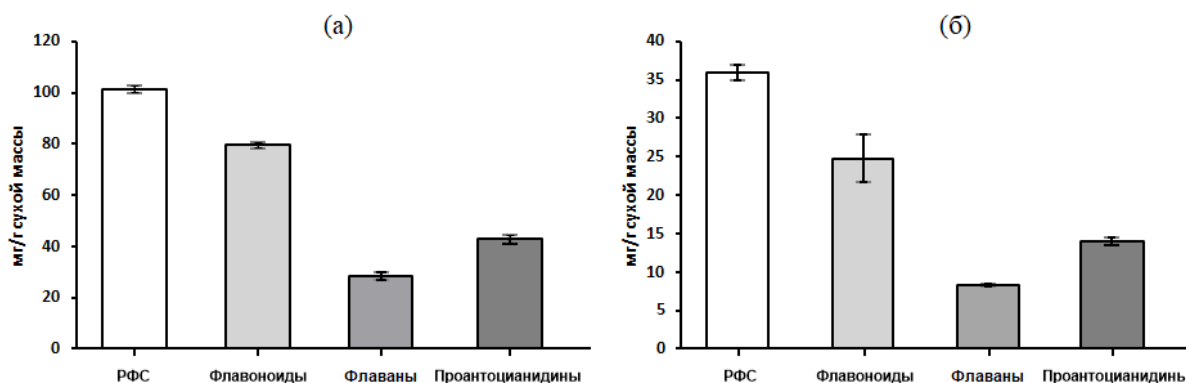


Рис. 2. Содержание фенольных соединений в каллусах, инициированных из листьев (а) и ягод (б) голубики щитковой *V. corymbosum*

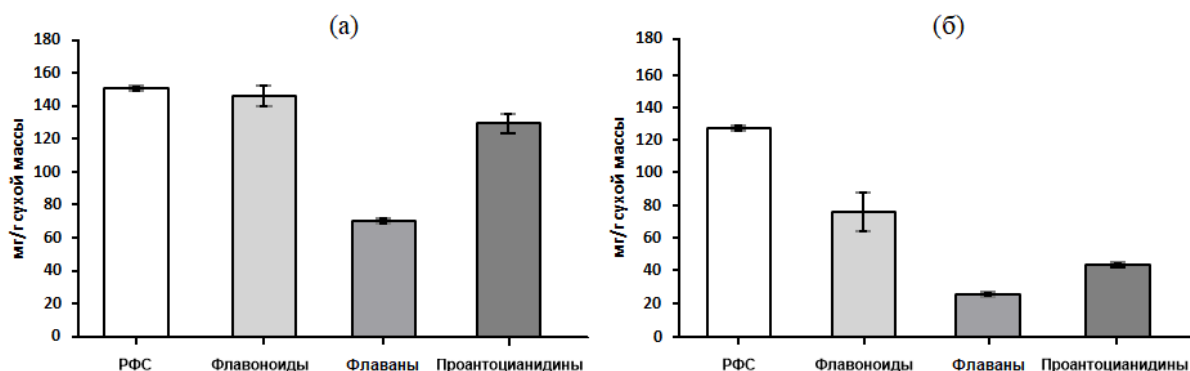


Рис. 3. Содержание фенольных соединений в суспензионных клетках голубики щитковой *V. corymbosum*, инициированных из каллусов листового (а) и ягодного (б) происхождения

Известно, что голубика щитковая характеризуется значительным накоплением в своих клетках фенольных соединений, особенно флавоноидной природы, включая их олигомеры проантоцианидины [12, 15–17, 19]. Согласно нашим результатам, высокое содержание фенольных соединений характерно как для листьев, так и для ягод этого вида растения, и, что не менее важно, оно сохранялось в условиях *in vitro* у каллусов и культур суспензионных клеток. По сравнению с другими видами голубики, а именно с голубикой черноплодной и топяной, голубика щитковая накапливала в листьях наибольшее количество фенольных соединений [12, 17]. Среди других вересковых растений сопоставимое содержание фенольных соединений выявлено в листьях и ягодах клюквы крупноплодной [18], клюквы болотной и брусники обыкновенной [6, 13], черники обыкновенной [20].

Каллусы, инициированные из листьев голубики щитковой, несмотря на довольно высокое содержание фенольных соединений, уступали по их содержанию первичным эксплантам – листьям – почти в два раза (рис. 1а и 2а). Выявленный нами уровень фенольных соединений был сопоставим с таковым у каллусов, инициированных ранее из листьев голубики щитковой [21] и клюквы крупноплодной [28] на питательных средах другого состава. Каллусы, инициированные из ягод голубики щитковой, тоже уступали первичным эксплантам – листьям – по содержанию РФС в два раза (рис. 1б и 2б), но сохраняли при этом такой же, как и в ягодах, уровень флавоноидов (в т.ч. флаванов) и проантоцианидинов. Очевидно, снижение содержания только РФС в каллусах ягодного происхождения по сравнению с самими ягодами произошло за счет снижения содержания в них нефлавоноидных соединений – например, фенольных кислот, в т.ч. фенилпропаноидного строения. Ранее для каллусов голубики щитковой сортов Bluecrop и Duke было показано значительное (по сравнению с листьями, из которых они были инициированы) снижение содержания в них такого фенилпропаноида, как кофейная кислота, а также кумаровых кислот [22]. В целом, каллусы, инициированные нами из ягод голубики щитковой, продемонстрировали присущий эксплантам пониженный, в сравнении с листьями и инициированными из листьев каллусами, уровень фенольных соединений.

В отличие от каллусов, инициированные нами культуры суспензионных клеток голубики щитковой обладали большей способностью к накоплению фенольных соединений: содержание всех групп фенольных соединений в культурах суспензионных клеток было примерно в три раза больше, чем в каллусных культурах, независимо от их происхождения (рис. 2 и 3). Исключение составило только содержание РФС у каллусных и суспензионных культур листового происхождения, которое различалось в 1.5 раза. Возможно, меньшая разница в уровне РФС, нежели в уровне флавоноидов, флаванов, проантоцианидинов, также связана со снижением у культур суспензионных клеток накопления нефлавоноидных соединений и перенаправлением фенилпропаноидов на синтез флавоноидных структур. Об изменении направленности фенольного метаболизма у культивируемых в условиях *in vitro* клеток по сравнению с эксплантатами также сообщалось в отношении кроветок [29], теветии [30], агератины [31].

В целом, по содержанию РФС и флавоноидов суспензионные клетки превосходили ягоды и приближались к листьям растений голубики щитковой. Стабильное накопление фенольных соединений культурами суспензионных клеток, сопоставимое с листьями и ягодами, среди вересковых растений показано для клеток брусники [2], черники [32] и охело [33]. Подчеркнем, что содержание флаванов и проантоцианидинов в суспензионных клетках, инициированных из каллусов листового происхождения, превышало таковое в листьях растений открытого грунта в 1.5–2 раза (рис. 1а и 3а). Такое явление можно объяснить участием указанных соединений, обладающих высокой антиоксидантной активностью, в защитных и адаптивных реакциях растительных клеток в условиях *in vitro* [29]. Необходимость защитных и адаптивных реакций суспензионных клеток связана с их периодическим субкультивированием на свежую питательную среду, с особенностями состава и pH питательной среды, в т.ч. с доступностью минеральных веществ, сахарозы и фитогормонов [30, 31], по сравнению с внутренними условиями (наличием организменного контроля) и условиями окружающей среды в случае клеток растений *in vivo*. Несомненно, увеличенное, по сравнению с листьями растений, накопление отдельных групп фенольных соединений суспензионными клетками имеет экономически важное значение при организации производств, использующих в качестве сырья растительные суспензионные культуры.

Выводы

Сравнительный анализ содержания фенольных соединений в листьях, ягодах, каллусах и суспензионных клетках голубики щитковой показал перспективность культуры суспензионных клеток для получения данных вторичных метаболитов; при этом в качестве экспланта предпочтительнее использовать листья, нежели ягоды. Учитывая, что культуры суспензионных клеток голубики щитковой способны накапливать флаваны и проантоцианидины в количестве, превышающем таковое у листьев, культуры суспензионных клеток могут стать достойной альтернативой растениям открытого грунта для промышленного выпуска продукции на основе растительных фенольных соединений. Для выявления состава индивидуальных фенольных соединений и для оценки биологического действия экстрактов из суспензионных клеток голубики щитковой требуются дополнительные исследования.

Финансирование

Работа поддержана грантом Российского научного фонда, № 23-24-00403.

Конфликт интересов

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Открытый доступ

Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), которая разрешает неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии, что вы дадите соответствующие ссылки на автора(ов) и источник и предоставите ссылку на Лицензию Creative Commons и укажете, были ли внесены изменения.

Список литературы

1. Dasiman R., Nor N.M., Eshak Z., Mutalip S.S.M., Suwandi N.R., Bidin H. A review of procyanidin: Updates on current bioactivities and potential health benefits // *Biointerface Reserch in Applied Chemistry*. 2022. Vol. 12, no. 5. Pp. 5918–5940. DOI: 10.33263/BRIAC125.59185940.
2. Qi Q., Chu M., Yu X., Xie Y., Li Y., Du Y., Liu X., Zhang Z., Shi J., Yan N. Anthocyanins and proanthocyanidins: Chemical structures, food sources, bioactivities, and product development // *Food Reviews International*. 2022. Vol. 39, no. 7. Pp. 4581–4609. DOI: 10.1080/87559129.2022.2029479.
3. Barkaoui S., Madureira J., Boudhrioua N., Verde S.C. Berries: effects on health, preservation methods, and uses in functional foods: a review // *European Food Research and Technology*. 2023. Vol. 249, no. 7. Pp. 1689–1715. DOI: 10.1007/s00217-023-04257-2.
4. Zhou W., Zhao L., Wang K., Renard C.M.G.C., Le Bourvellec C., Hu Z., Liu X. Plant leaf proanthocyanidins: from agricultural production by-products to potential bioactive molecules // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2023. DOI: 10.1080/10408398.2023.2244079.
5. Zhang W., Furusaki S. Production of anthocyanins by plant cell cultures // *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 1999. Vol. 4, no. 4. Pp. 231–252.
6. Артемкина Н.А. Фенольные соединения *Vaccinium vitis-idaea* и их ответ на воздействие различных факторов окружающей среды // *Химия растительного сырья*. 2019. №2. С. 59–66. DOI: 10.14258/jcprm.2019024090.
7. Rischer H., Nohynek L., Puupponen-Pimiä R., Aguiar J., Rocchetti G., Lucini L., Camara J.S., Cruze T.M., Marques M.B., Granato D. Plant cell cultures of Nordic berry species: Phenolic and carotenoid profiling and biological assessments // *Food Chemistry*. 2022. Vol. 366. Pp. 130571–130581. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.130571.
8. Dias M.I., Sousa M.J., Alves R.C., Ferreira I.C.F.R. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review // *Industrial Crops and Products*. 2016. Vol. 82. Pp. 9–22. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.12.016.
9. Matkowski A. Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants – A review // *Biotechnology Advances*. 2008. Vol. 26, no. 6. Pp. 548–560. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.07.001.
10. Попова Е.В., Носов А.В., Титова М.В., Кочкин Д.В., Фоменков А.А., Куличенко И.Е., Носов А.М. Перспективные биотехнологии: коллекции культур клеток высших растений как основа разработки и производства лекарственных препаратов // *Физиология растений*. 2021. Т. 68. С. 227. DOI: 10.31857/S0015330321030167.
11. Носов А.М. Использование клеточных технологий для промышленного получения биологически активных веществ растительного происхождения // *Биотехнология*. 2010. №5. С. 8–28.
12. Павлова Е.Е., Березина Е.В., Мишукова И.В., Брилкина А.А. Анализ содержания фенольных соединений и аскорбиновой кислоты у различных видов голубики (*Vaccinium* L.) в периоды цветения и плодоношения // *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского*. 2012. №2-3. С. 222–229.
13. Березина Е.В., Брилкина А.А., Веселов А.П. Содержание фенольных соединений в листьях и плодах *Vaccinium vitis-idaea* и *Oxycoccus palustris* (Ericaceae) в разные периоды вегетации // *Растительные ресурсы*. 2015. Т. 51, №1. С. 88–100.
14. Лютикова М.Н., Ботиров Э.Х. Химический состав и практическое применение ягод брусники и клюквы // *Химия растительного сырья*. 2015. №2. С. 5–27. DOI: 10.14258/jcprm.2015022429.

15. Мухаметова С.В., Скочилова Е.А., Протасов Д.В. Параметры плодоношения и содержание флавоноидов и аскорбиновой кислоты в плодах голубики (*Vaccinium*) // Химия растительного сырья. 2017. №3. С. 113–121. DOI: 10.14258/jcprm.2017031785.
16. Лазарев А.С., Кляузов А.В., Ручкина А.Г., Кобраков К.И., Шпигун Л.К. Состав и антиоксидантные свойства из листьев голубики высокорослой (*Vaccinium corymbosum* L.) // Химия растительного сырья. 2019. №4. С. 223–232. DOI: 10.14258/jcprm.2019045498.
17. Зубова М.Ю., Нечаева Т.Л., Стахеева Т.С., Васильева О.Г., Коновалова Л.Н., Гончарук Е.А., Загоскина Н.В. Биоразнообразие сортов *Vaccinium corymbosum* L., их распространение и содержание антиоксидантов фенольной природы // Сборник трудов Международной научной конференции молодых ученых «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения». М., 2020. С. 71–77. DOI: 10.52101/9785870190921_2021_8_71.
18. Berezina E.V., Brilkina A.A., Veselov A.P. Content of phenolic compounds, ascorbic acid, and photosynthetic pigments in *Vaccinium macrocarpon* Ait. dependent on seasonal plant development stages and age (the example of introduction in Russia) // Scientia Horticulturae. 2017. Vol. 218. Pp. 139–146. DOI: 10.1016/j.scienta.2017.01.020.
19. Wu Y., Yang H., Huang Z., Zhang C., Lyu L., Li W., Wu W. Metabolite profiling and classification of highbush blueberry leaves under different shade treatments // Metabolites. 2022. Vol. 12, no. 1. Pp. 79–93. DOI: 10.3390/metabo12010079.
20. Ștefănescu R., Laczkó-Zöld E., Ősz B.-E. Vari C.-E. An updated systematic review of *Vaccinium myrtillus* leaves: Phytochemistry and pharmacology // Pharmaceutics. 2023. Vol. 15, no. 1. Pp. 16–38. DOI: 10.3390/pharmaceutics/15010016.
21. Ramata-Stunda A., Valkovska V., Borodušakis M., Livkiša D., Kaktiņa E., Silamiķele B., Boroduške A., Pentjušs A., Rostoks N. Development of metabolic engineering approaches to regulate the content of total phenolics, antiradical activity and organic acids in callus cultures of the highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) // Agronomy Research. 2020. Vol. 18, no. 3. Pp. 1860–1872. DOI: 10.15159/AR.20.054.
22. Gamil R.A.E.-D., Khusnetdinova L.Z., Akulov A.N., Walla M.A.A., Timofeeva O.A. Influence of light on the accumulation of anthocyanins in callus culture of *Vaccinium corymbosum* L. cv. Sunt Blue Giant // Journal of Photochemistry and Photobiology. 2021. Vol. 8. Pp. 100058–100067. DOI: 10.1016/j.jpap.2021.100058.
23. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микроклонального размножения растений. Киев, 1992. 232 с.
24. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и методы их исследования // Биохимические методы в физиологии растений. М., 1971. С. 185–197.
25. Gunes G., Liu R.H., Watkins C.B. Controlled-atmosphere effects on postharvest quality and antioxidant activity of cranberry fruits // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002. Vol. 50, №21. Pp. 5932–5938. DOI: 10.1021/jf025572c.
26. Хишова О.М., Бузук Г.Н. Количественное определение процианидинов плодов боярышника // Химико-фармацевтический журнал. 2006. Т. 40. С. 20. DOI: 10.30906/0023-1134-2006-40-2-20-21.
27. Zhan W., Liao X., Xie R.-J., Tian T., Yu L., Liu X., Liu J., Li P., Han B., Yang T., Zhang B., Cai L.-J., Li R., Yang Q. The effects of blueberry anthocyanins on histone acetylation in rat liver fibrosis // Oncotarget. 2017. Vol. 8, no. 57. Pp. 96761–96773. DOI: 10.18632/oncotarget.17842.
28. Березина Е.В., Брилкина А.А., Щурова А.В., Веселов А.П. Накопление биомассы и фенольных соединений каллусами *Oxycoccus palustris* Pers. и *O. macrocarpus* (Ait.) Pers. в присутствии разных цитокининов // Физиология растений. 2019. Т. 66, №1. С. 35–45. DOI: 10.1134/s0015330318050032.
29. Акулов А.Н. Фенольные соединения культуры клеток крохоблики лекарственной *Sanquisorba officinalis* (L.) // Химия растительного сырья. 2019. №1. С. 241–250. DOI: 10.14258/jcprm.2019014119.
30. Mendoza D., Arias J.P., Cuaspid O., Arias M. Phytochemical screening of callus and cell suspensions cultures of *Thevetia peruviana* // Brazilian Archives of Biology and Technology. 2020. Vol. 63. e20180735. DOI: 10.1590/1678-4324-2020180735.
31. Motolinia-Alcántara E.A., Franco-Vásquez A.M., Nieto-Camacho A., Arreguín-Espinosa R., Rodríguez-Monroy M., Cruz-Sosa F., Román-Guerrero A. Phenolic compounds from wild plant and *in vitro* cultures of *Ageratina pichichensis* and evaluation of their antioxidant activity // Plants. 2023. Vol. 12, no. 5. Pp. 1107–1123. DOI: 10.3390/plants12051107.
32. Suvanto J., Nohynek L., Seppänen-Laakso T., Rischer H., Salminen J.-P., Puupponen-Pimiä R. Variability in the production of tannins and other polyphenols in cell cultures of 12 Nordic plant species // Planta. 2016. Vol. 246, no. 2. Pp. 227–241. DOI: 10.1007/s00425-017-2886-8.
33. Yousef G.G., Seigler D.S., Grusak M.A., Rogers R.B., Knight C.T., Kraft T.F., Erdman Jr. J.W., Lila M.A. Biosynthesis and characterization of ¹⁴C-enriched flavonoid fractions from plant cell suspension cultures // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2004. Vol. 52, no. 5. Pp. 1138–1145. DOI: 10.1021/jf035371o.

Поступила в редакцию 24 ноября 2023 г.

После переработки 6 декабря 2023 г.

Принята к публикации 6 декабря 2023 г.

*Berezina E.V.**, Rybin D.A., Sukhova A.A., Syomin A.A., Mishukova I.V., Brilkina A.A. COMPARATIVE ANALYSIS OF PHENOLIC COMPOUNDS CONTENT IN *VACCINIUM CORYMBOSUM* L. TISSUES AND CELLS IN *IN VIVO* AND *IN VITRO* CONDITIONS

Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Gagarina av., 23, Nizhny Novgorod, 603022, Russia, berezina.kat@gmail.com

In leaves, berries, calluses, and suspension cells of highbush blueberry *Vaccinium corymbosum* L. it was photometrically determined content of phenolic compounds (i.e. soluble phenolic compounds, flavonoids, flavans, and proanthocyanidins). It was shown that highbush blueberry callus and suspension cultures retain the ability to accumulate phenolic compounds, which is comparable to the species leaves and berries. In particular, content of soluble phenolic compounds in leaves is about 270 mg/g dry weight, in berries it is about 70 mg/g dry weight, in calluses it reaches 35–102 mg/g dry weight, and in suspension cultures it reaches 125–150 mg/g dry weight depending on cultures origin (on explant type). In phenolic complex of callus and suspension cultures, as well as in those of leaves, flavonoids predominate (25–146 mg/g dry weight and 180 mg/g dry weight, respectively), and in suspension cultures, initiated from calluses of leaf origin, flavans and proanthocyanidins accumulation increases in comparison with leaves. This study indicates that highbush blueberry suspension cultures, initiated from calluses of leaf origin, may serve as an alternative to plants from greenhouse for production of economically valuable phenolic compounds characteristic of heather plants.

Keywords: *Vaccinium corymbosum*, leaves, berries, calluses, cell suspension culture, phenolic compounds.

For citing: Berezina E.V., Rybin D.A., Sukhova A.A., Syomin A.A., Mishukova I.V., Brilkina A.A. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2024, no. 3, pp. 129–137. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.20240313979.

References

1. Dasiman R., Nor N.M., Eshak Z., Motalip S.S. M., Suwandi N.R., Bidin H. *Biointerface Reserch in Applied Chemistry*, 2022, vol. 12, no. 5, pp. 5918–5940. DOI: 10.33263/BRIAC125.59185940.
2. Qi Q., Chu M., Yu X., Xie Y., Li Y., Du Y., Liu X., Zhang Z., Shi J., Yan N. *Food Reviews International*, 2022, vol. 39, no. 7, pp. 4581–4609. DOI: 10.1080/87559129.2022.2029479.
3. Barkaoui S., Madureira J., Boudhrioua N., Verde S.C. *European Food Research and Technology*, 2023, vol. 249, no. 7, pp. 1689–1715. DOI: 10.1007/s00217-023-04257-2.
4. Zhou W., Zhao L., Wang K., Renard C.M.G.C., Le Bourvellec C., Hu Z., Liu X. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023. DOI: 10.1080/10408398.2023.2244079.
5. Zhang W., Furusaki S. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 1999, vol. 4, no. 4, pp. 231–252.
6. Artemkina N.A. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2019, no. 2, pp. 59–66. DOI: 10.14258/jcprm.2019024090. (in Russ.).
7. Rischer H., Nohynek L., Puupponen-Pimiä R., Aguiar J., Rocchetti G., Lucini L., Camara J.S., Cruze T.M., Marques M.B., Granato D. *Food Chemistry*, 2022, vol. 366, pp. 130571–130581. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.130571.
8. Dias M.I., Sousa M.J., Alves R.C., Ferreira I.C.F.R. *Industrial Crops and Products*, 2016, vol. 82, pp. 9–22. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.12.016.
9. Matkowski A. *Biotechnology Advances*, 2008, vol. 26, no. 6, pp. 548–560. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.07.001.
10. Popova Ye.V., Nosov A.V., Titova M.V., Kochkin D.V., Fomenkov A.A., Kulichenko I.Ye., Nosov A.M. *Fiziologiya rasteniy*, 2021, vol. 68, p. 227. DOI: 10.31857/S0015330321030167. (in Russ.).
11. Nosov A.M. *Biotehnologiya*, 2010, no. 5, pp. 8–28. (in Russ.).
12. Pavlova Ye.Ye., Berezina Ye.V., Mishukova I.V., Brilkina A.A. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo*, 2012, no. 2-3, pp. 222–229. (in Russ.).
13. Berezina Ye.V., Brilkina A.A., Veselov A.P. *Rastitel'nyye resursy*, 2015, vol. 51, no. 1, pp. 88–100. (in Russ.).
14. Lyutikova M.N., Botirov E.Kh. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2015, no. 2, pp. 5–27. DOI: 10.14258/jcprm.2015022429. (in Russ.).
15. Mukhametova S.V., Skochilova Ye.A., Protasov D.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2017, no. 3, pp. 113–121. DOI: 10.14258/jcprm.2017031785. (in Russ.).
16. Lazarev A.S., Klyauzov A.V., Ruchkina A.G., Kobrakov K.I., Shpigun L.K. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2019, no. 4, pp. 223–232. DOI: 10.14258/jcprm.2019045498. (in Russ.).
17. Zubova M.Yu., Nechayeva T.L., Stakheyeva T.S., Vasil'yeva O.G., Konovalova L.N., Goncharuk Ye.A., Zagorskina N.V. *Sbornik trudov Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii molodykh uchenykh "Sovremennyye tendentsii razvitiya tekhnologiy zdorov'yesbezheniya"*. [Collection of works of the International scientific conference of young scientists "Modern trends in the development of health-preserving technologies"]. Moscow, 2020, pp. 71–77. DOI: 10.52101/9785870190921_2021_8_71. (in Russ.).
18. Berezina E.V., Brilkina A.A., Veselov A.P. *Scientia Horticulturae*, 2017, vol. 218, pp. 139–146. DOI: 10.1016/j.scienta.2017.01.020.
19. Wu Y., Yang H., Huang Z., Zhang C., Lyu L., Li W., Wu W. *Metabolites*, 2022, vol. 12, no. 1, pp. 79–93. DOI: 10.3390/metabo12010079.
20. Ștefănescu R., Laczkó-Zöld E., Ösz B.-E. Vari C.-E. *Pharmaceutics*, 2023, vol. 15, no. 1, pp. 16–38. DOI: 10.3390/pharmaceutics/15010016.

* Corresponding author.

21. Ramata-Stunda A., Valkovska V., Borodušis M., Livkiša D., Kaktiņa E., Silamiķe B., Boroduške A., Pentjušs A., Rostoks N. *Agronomy Research*, 2020, vol. 18, no. 3, pp. 1860–1872. DOI: 10.15159/AR.20.054.
22. Gamil R.A.E.-D., Khusnetdinova L.Z., Akulov A.N., Walla M.A.A., Timofeeva O.A. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 2021, vol. 8, pp. 100058–100067. DOI: 10.1016/j.jpap.2021.100058.
23. Kalinin F.L., Kushnir G.P., Sarnatskaya V.V. *Tekhnologiya mikroklonal'nogo razmnozheniya rasteniy*. [Technology of microclonal propagation of plants]. Kiyev, 1992, 232 p. (in Russ.).
24. Zaprometov M.N. *Biokhimicheskiye metody v fiziologii rasteniy*. [Biochemical methods in plant physiology]. Moscow, 1971, pp. 185–197. (in Russ.).
25. Gunes G., Liu R.H., Watkins C.B. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, vol. 50, no. 21, pp. 5932–5938. DOI: 10.1021/jf025572c.
26. Khishova O.M., Buzuk G.N. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*, 2006, vol. 40, p. 20. DOI: 10.30906/0023-1134-2006-40-2-20-21. (in Russ.).
27. Zhan W., Liao X., Xie R.-J., Tian T., Yu L., Liu X., Liu J., Li P., Han B., Yang T., Zhang B., Cai L.-J., Li R., Yang Q. *Oncotarget*, 2017, vol. 8, no. 57, pp. 96761–96773. DOI: 10.18632/oncotarget.17842.
28. Berezina Ye.V., Brilkina A.A., Shchurova A.V., Veselov A.P. *Fiziologiya rasteniy*, 2019, vol. 66, no. 1, pp. 35–45. DOI: 10.1134/s0015330318050032. (in Russ.).
29. Akulov A.N. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2019, no. 1, pp. 241–250. DOI: 10.14258/jcprm.2019014119. (in Russ.).
30. Mendoza D., Arias J.P., Cuaspuud O., Arias M. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2020, vol. 63, e20180735. DOI: 10.1590/1678-4324-2020180735.
31. Motolinia-Alcántara E.A., Franco-Vásquez A.M., Nieto-Camacho A., Arreguín-Espinosa R., Rodríguez-Monroy M., Cruz-Sosa F., Román-Guerrero A. *Plants*, 2023, vol. 12, no. 5, pp. 1107–1123. DOI: 10.3390/plants12051107.
32. Suvanto J., Nohynek L., Seppänen-Laakso T., Rischer H., Salminen J.-P., Puupponen-Pimiä R. *Planta*, 2016, vol. 246, no. 2, pp. 227–241. DOI: 10.1007/s00425-017-2886-8.
33. Yousef G.G., Seigler D.S., Grusak M.A., Rogers R.B., Knight C.T., Kraft T.F., Erdman Jr. J.W., Lila M.A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, vol. 52, no. 5, pp. 1138–1145. DOI: 10.1021/jf035371o.

Received November 24, 2023

Revised December 6, 2023

Accepted December 6, 2023

Сведения об авторах

Березина Екатерина Васильевна – кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии и биотехнологии, berezina.kat@gmail.com

Рыбин Дмитрий Алексеевич – аспирант, ivan.rybin.1990@mail.ru

Сухова Алина Алекберовна – студент, alinaismailova2000@bk.ru

Сёмин Андрей Анатольевич – студент, siom.andrei@yandex.ru

Мишукова Ирина Валентиновна – ведущий биолог коллекционного отдела ботанического сада, sad@bio.unn.ru

Брилкина Анна Александровна – заведующая кафедрой биохимии и биотехнологии, кандидат биологических наук, annbril@mail.ru

Information about authors

Berezina Ekaterina Vasilievna – candidate of biological sciences, associate professor of the department of biochemistry and biotechnology, berezina.kat@gmail.com

Rybin Dmitry Alekseevich – postgraduate student, ivan.rybin.1990@mail.ru

Sukhova Alina Alekberovna – student, alinaismailova2000@bk.ru

Syomin Andrey Anatolyevich – student, siom.andrei@yandex.ru

Mishukova Irina Valentinovna – leading biologist of the collection department of the botanical garden, sad@bio.unn.ru

Brilkina Anna Aleksandrovna – head of the department of biochemistry and biotechnology, candidate of biological sciences, annbril@mail.ru