

16. Savita G. Virk A. Nagpal. *In vitro* selection of calli of *Citrus jambhiri* Lush, for tolerance to culture filtrate of *Phitophthora parasitica* and their regeneration // *Phisiol Mol Biol Plants*. –2011. – Vol. 17(1). – P. 41-47. – <https://doi.org/10.1007/s12298-010-0046-2>.

**ASSESSMENT OF *POPULUS* L. SALT RESISTANCE  
UNDER SIMULATED STRESS CONDITIONS *IN VITRO***

**Amineva Ye.Yu.<sup>1</sup>, Tabatskaya T.M.<sup>1</sup>, Mashkina O.S.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Federal State Budgetary Institution  
“Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology”*

<sup>2</sup>*Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education  
“Voronezh State University”*

*Voronezh, Russia, e-mail: elena.pardaeva@mail.ru*

Due to global climate changes and increase in the speed and scale of anthropogenic loads, the need for plants with increased resistance to various stressors for conserving and restoring forest genetic resources increases annually. Poplar (*Populus* L.) refers to species characterized by early maturity, rapid growth and ecological plasticity, which contributes to solving these issues aiming to increase productivity and growing terms of forest plantations. This paper presents the experiment carried out in order to study the response of poplar, taken from the collection of long-term storage *in vitro*, to a simulated stress - salinity (NaCl), as one of the most common abiotic stresses. It was found that all the clones involved in the experiment were susceptible to the given stress factor. The interclonal and intraclonal variability of poplar in relation to the stressor is shown.

**Key words:** poplar, *in vitro*, stress, resistance, salinity.

УДК 581.1

doi: 10.31360/2225-3068-2021-79-66-74

**ГОЛУБИКА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*:  
МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ, МОРФОМЕТРИЯ,  
СОДЕРЖАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ БИОАНТИОКСИДАНТОВ**

**Нечаева Т.Л.<sup>1</sup>, Зубова М.Ю.<sup>1</sup>, Стахеева Т.С.<sup>2</sup>, Васильева О.Г.<sup>2</sup>,  
Коновалова Л.Н.<sup>2</sup>, Загоскина Н.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук*

<sup>2</sup>*Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук*

*г. Москва, Россия, e-mail: NechaevaTatyana.07@yandex.ru*

Исследовано микроразмножение, морфометрические показатели и накопление фенольных соединений, в том числе и флавоноидов, в *in vitro* микропобегах голубики (сорта ‘Норт Кантри’ и ‘Блюкроп’). Установлена более высокая скорость микроразмножения сорта ‘Норт Кантри’ по сравнению с сортом ‘Блюкроп’. Показаны отличия в количестве и размерах их листьев.

Отмечено повышение прироста микропобегов сорта 'Норт Кантри' с 36 по 56 дни выращивания (на 15 %), что не характерно для сорта 'Блюкроп', где оно не изменялось. Содержание фенольных соединений в *in vitro* микропобегах сорта 'Блюкроп' на 36 день роста превышало таковое 56 дня на 30 %, а флавоноидов – на 20 %, соответственно. В микропобегах сорта 'Норт Кантри' в течение всего пассажа количество этих вторичных метаболитов сохранялось на одном уровне.

**Ключевые слова:** голубика, *Vaccinium L.*, клональное микроразмножение, рост, фенольные соединения, флавоноиды.

Сохранения генофонда растений нашей планеты, в том числе в условиях *in vitro*, является одним из приоритетных направлений биотехнологии. Особенно важно это в отношении фармакологически ценных видов, которые синтезируют вторичные метаболиты, успешно применяемые при лечении заболеваний различной этиологии [4, 16, 23].

Фенольные соединения – одни из наиболее распространённых веществ так называемого «специализированного» (вторичного) метаболизма, накапливающиеся практически во всех растительных тканях [5, 15]. Для них характерно большое структурное разнообразие и различная функциональная роль. Известно участие фенольных соединений в регуляции роста и развития растений, фотосинтеза, дыхания, аллелопатии, защиты от стрессовых воздействий и других процессов [5, 21].

Среди дикорастущих ягодных растений большой интерес вызывают представители рода *Vaccinium L.*, к числу которых относится голубика. Эта культура и продукты её переработки успешно используются в качестве функциональных продуктов питания, нутрицевтиков и ингредиентов для органической косметики [7, 17]. Голубику относят к особо рекомендуемым диетическим продуктам и применяют при профилактике заболеваний сердечно-сосудистой системы, органов дыхания, желудочно-кишечного тракта, новообразований и пр. [19]. В определённой степени многие из этих эффектов обусловлены накоплением в различных её органах фенольных соединений, а именно фенилпропаноидов, флавонолов, антоцианов, катехинов, проантоцианидинов [12, 24]. Образование этих метаболитов может быть той «основой», которая определяет фармакологическую ценность голубики [22].

Сохранения генофонда различных дикорастущих ягодников возможно методами биотехнологии, в том числе за счёт их клонального микроразмножения в условиях *in vitro* [2, 6]. Это касается и голубики, работы с которой проводятся в лаборатории биотехнологии растений Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН (Москва) [13]. Получены данные по оптимизации питательных сред для её роста, проведена оценка их эффективности и другим аспектам её размножения [8, 14]. Однако

практически нет данных об образовании в *in vitro* микропобегах голубики фенольных соединений – фармакологически ценных метаболитов и факторов устойчивости растений к стрессовым воздействиям [17, 20].

**Целью работы** было изучение растений *in vitro*, полученных методом клонального микроразмножения перспективных сортов высокой и полувисокой голубики, оценке их микроразмножения, морфофизиологических характеристик и образования фенольных биоантиоксидантов, включая флавоноиды.

**Объекты и методы.** Объектом исследования были культивируемые *in vitro* микропобеги голубики (*Vaccinium corymbosum* L.) сортов ‘Норт Кантри’ (‘North Country’) и ‘Блюкроп’ (‘Bluecrop’) из коллекции ГБС РАН. Сорт ‘Блюкроп’ (*V. corymbosum* cv. Bluecrop) относится к высокорослым представителям голубики, достигающим высоты до 1,6–2,0 м [17]. Для этих растений характерен декоративный вид с весны до осени, благодаря красивой листве, крупным цветкам и плодам [18]. Сорт устойчив к засухе и действию низких температур. Растения сорта ‘Норт Кантри’ (*V. corymbosum* × *V. angustifolium* cv. North Country) относятся к полувисокорослым гибридным сортам голубики (высота до 0,9 м) с коротким периодом вегетации. Благодаря компактному невысокому кусту, они имеют высокую декоративность. Это сорт северный, отлично переносит даже действие сильных морозов, устойчив к болезням и не требователен к почвам [17].

В качестве исходных эксплантов для клонального микроразмножения использовали апикальные и латеральные почки побегов интактных растений с небольшими участками стебля [14]. Микропобеги выращивали на питательной среде Андерсена с добавлением индолил-3-уксусной кислоты (1 мг/л) и 2-изопентиладенина (5 мг/л) при 16-часовом фотопериоде, температуре 23–25 °С, влажности 70 % и освещении 3 000 люкс [9]. Длительность пассажа составляла 60 дней. Срок культивирования в условиях *in vitro* – 4 года.

Для исследований использовали микропобеги различного возраста (36 и 56 дней), которые фиксировали жидким азотом и хранили при –70 °С до проведения биохимических исследований.

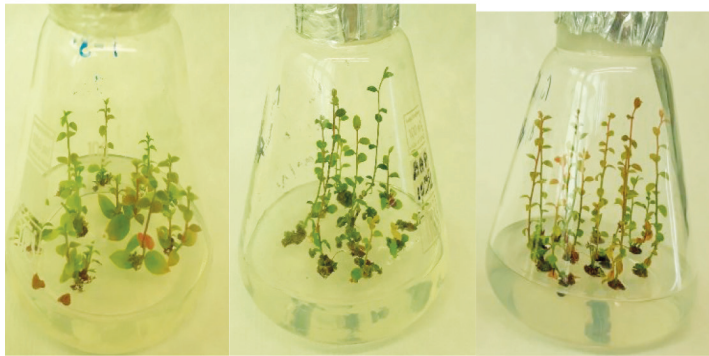
Оценивали морфологические параметры микропобегов по их внешнему виду (визуальная оценка), высоте (простое измерение), расположению листьев и коэффициенту микроразмножения.

Содержания воды в растительном материале определяли стандартным методом после их высушивания до постоянной массы в термостате при температуре 70 °С [10].

Фенольные соединения извлекали 96%-ным этанолом из измельченного после замораживания растительного материала. Гомогенат выдерживали при 45 °С в течение 45 мин, центрифугировали (16 000 об./мин, 15 мин) и надосадочную жидкость использовали для спектрофотометрического

определения содержания фенольных соединений (реактив Фолина-Чокольтеу) и содержания флавоноидов (2%-ный раствор  $AlCl_3$ ) [3, 11]. Расчёт содержания фенольных соединений производили по галловой кислоте, расчёт содержания флавоноидов – по рутину. В экспериментах использовали 5-кратную биологическую и 3-кратную аналитическую повторность измерений. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программ Microsoft Excel 2010 и SigmaPlot 12.2. В таблице представлены средние арифметические значения определений и их стандартные отклонения. Надстрочные символы обозначают достоверность различий средних значений по t-критерию Стьюдента при  $p < 0.050$ .

**Результаты и их обсуждение.** Важным аспектом выращивания микропобегов в условиях *in vitro* является оценка их морфофизиологических и биохимических характеристик [4, 6, 10]. Как следует из представленных на рисунке 1 данных, эффективность микроразмножения у *in vitro* растений сорта ‘Норт Кантри’ была выше, чем у сорта ‘Блюкроп’. Это хорошо прослеживалось по числу формируемых у них микропобегов. При этом они отличались по формированию листьев на микропобегах: у сорта ‘Блюкроп’ их количество было меньше, а размер больше, чем у сорта ‘Норт Кантри’. Эти различия в большей степени проявляются на 36 день роста (рис. 1А, Б). Следует также отметить, что к концу выращивания (56 день) листья микропобегов приобретали красноватую пигментацию, что, по-видимому, обусловлено накоплением в них антоцианов – одних из представителей фенольных соединений. Эта тенденция в большей степени была выражена у микропобегов голубики сорта ‘Норт Кантри’ (рис. 1В). О повышении содержания антоцианов в листьях растений на завершающих этапах роста сообщалось в литературе [5].



А

Б

В

**Рис. 1.** Внешний вид *in vitro* культивируемых растений голубики сортов ‘Блюкроп’ (А) и ‘Норт Кантри’ (Б, В), полученных методом микроклонального микроразмножения.

А, Б – возраст 36 дней, В – возраст 56 дней

Выявлены и некоторые отличия в морфометрических и физиологических параметрах микропобегов голубики, выращиваемых в условиях *in vitro* (табл. 1).

Таблица 1

**Морфометрические и физиологические параметры *in vitro* микропобегов голубики**

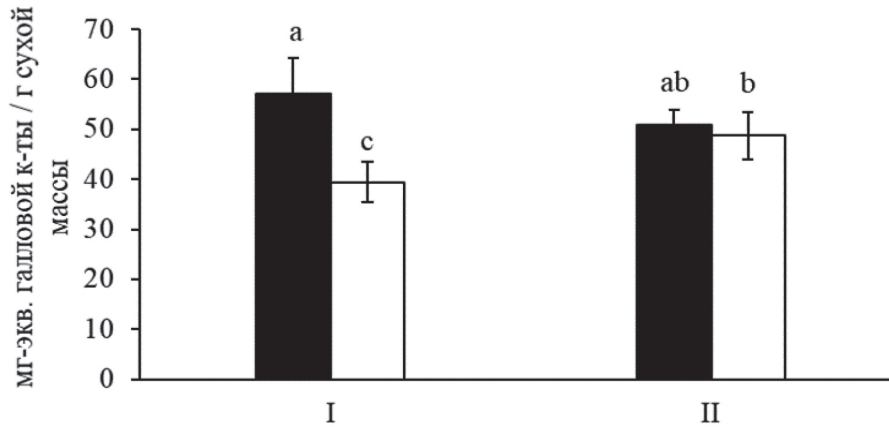
Показатель	Возраст, дни	Сорт	
		‘Блюкроп’	‘Норт Кантри’
Высота побега, см	36	2,0 ±0,1 <sup>a</sup>	2,8 ±0,2 <sup>b</sup>
	56	2,1 ±0,2 <sup>a</sup>	3,3 ±0,2 <sup>c</sup>
Оводнённость, %	36	74,56 ±0,29 <sup>a</sup>	71,79 ±1,97 <sup>b</sup>
	56	72,51 ±0,57 <sup>b</sup>	69,40 ±1,97 <sup>b</sup>

У микропобегов голубики сорта ‘Блюкроп’ прирост сохранялся практически на одном уровне в течение всего цикла культивирования, тогда как у сорта ‘Норт Кантри’ он повышался на 15 %. Исходя из этих данных можно предположить наличие у них низкой пролиферативной активности, как это отмечалось и другими авторами [17].

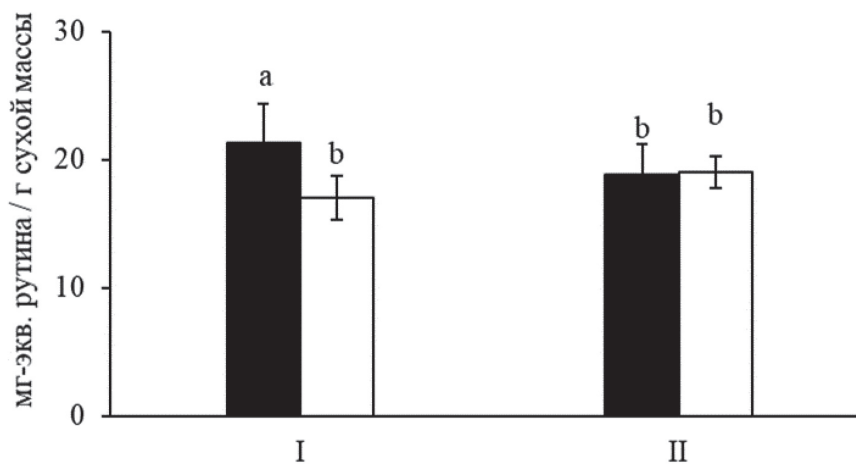
Микропобеги двух сортов голубики, полученные методом клонального микроразмножения и культивируемые в условиях *in vitro* несколько лет, отличались и по оводнённости тканей (табл. 1). У сорта ‘Блюкроп’ она была выше. Большие значения этого показателя отмечены у побегов 36-дневного возраста по сравнению с 56-дневными. Всё это свидетельствует об отличиях в физиологических параметрах микропобегов двух сортов голубики, что ещё раз подтверждает тезис о сохранении/проявлении в условиях *in vitro* сортоспецифичности исходных тканей [4, 17].

Определение содержания фенольных соединений в тканях растений служит показателем их биосинтетической способности в отношении эффективности биосинтеза этих вторичных метаболитов [3, 10]. Согласно полученным данным, в *in vitro* микропобегах голубики сорта ‘Блюкроп’ на 36 день роста оно было значительно выше, чем на 56 день. Это свидетельствует о более высокой биосинтетической способности молодых микропобегов в отношении биосинтеза этих веществ вторичного метаболизма, по сравнению с завершающими этапами роста (рис. 2А). Об изменениях в накоплении фенольных соединений по мере онтогенеза растительных тканей сообщалось и в литературе [5, 25]. Иная тенденция отмечена для микропобегов сорта ‘Норт Кантри’, у которых в течение всего периода роста их количество сохранялось на одном уровне. В определенной степени аналогичные тенденции характерны и для

накопления флавоноидов в микропобегах двух сортов голубики (рис. 2Б). Однако снижение в их содержании у сорта ‘Блюкроп’ составило 20 %, тогда как в отношении фенольных соединений – 30 %. Известно, что основными компонентами фенольных комплексов растительных тканей являются фенилпропаноиды и флавоноиды [5].



А



Б

**Рис. 2.** Содержание фенольных соединений (А) и флавоноидов (Б) в *in vitro* культивируемых микропобегах голубики сортов ‘Блюкроп’ (I) и ‘Норт Кантри’ (II), полученных методом микроклонального микроразмножения и выращиваемых в течение 36 и 56 дней (тёмный и светлый столбец, соответственно)

Поскольку в микропобегах голубики сорта 'Блюкроп' количество фенольных соединений уменьшалось в большей степени, чем количество флавоноидов, то можно предположить, что для последних стадий их роста характерно снижение биосинтеза фенольных соединений и, в большей степени, начальных его этапов – биосинтеза фенилпропаноидов [4, 5, 21].

Следует также отметить, что у микропобегов двух сортов голубики, длительно выращиваемых в условиях *in vitro*, на завершающих этапах культивирования количество флавоноидов – наиболее распространенных в зеленых тканях растений соединений фенольной природы – практически равное (рис. 2Б). Это косвенно свидетельствует о сходстве их фенольного метаболизма. Это предполагает продолжение исследований в этой области, поскольку состав фенольных метаболитов может быть использован в качестве критерия систематики и филогении растений [1].

**Заключение.** Всё вышеизложенное свидетельствует о том, что клональное микроразмножение растений голубики и их последующее культивирование позволяет сохранять ценные генотипы культур промышленного использования в условиях *in vitro*. Кроме того, эти объекты могут служить основой для фундаментальных исследований по оценке способности *in vitro* культур в отношении накопления различных вторичных метаболитов, к числу которых относятся фенольные биоантиоксиданты – вещества, предотвращающие развитие окислительного стресса в клетках растений, животных и человека.

*Работа выполнена при финансовой поддержке  
Минобрнауки РФ в рамках темы государственного задания  
ИФР РАН (№ АААА-А-19-11904189005-8) и государственного  
задания ГБС РАН (№18-118021490111).*

#### Библиографический список

1. Высочина Г.И. Фенольные соединения в систематике и филогении семейства гречишные (*Polygonaceae* Juss.) // *Turczaninowia*. – 2003. – Т. 6. – № 1. – С. 73-87. – ISSN 1560-7259.
2. Гвасалия М.В. Клональное микроразмножение растений чая (*Thea sinensis* L.) в культуре *in vitro* // *Садоводство и виноградарство*. – 2013. – № 4. – С. 20-23. – ISSN 0235-2591.
3. Загоскина Н.В., Казанцева В.В., Фесенко А.Н., Широкова А.В. Накопление фенольных соединений на начальных этапах онтогенеза растений с различным уровнем плоидности (на примере *Fagopyrum esculentum*) // *Известия РАН. Серия биологическая*. – 2018. – № 2. – С. 191-199. – <https://doi.org/10.7868/S000233291802008X>.
4. Загоскина Н.В., Назаренко Л.В. Вторичные метаболиты растений и биотехнология. – М., Ярославль: Филигрань, 2019. – 155 с. – ISBN 978-5-6043691-1-1.
5. Запрометов М.Н. Фенольные соединения. Распространение, метаболизм и функции в растениях. – М.: Наука, 1993. – 272 с.
6. Калашникова Е.А. Клеточная инженерия растений. – М.: РГАУ-МСХА, 2012. – 318 с. – ISBN 978-5-534-11790-5.

7. Лазарев А.С., Кляузова А.В., Ручкина А.Г., Кобраков К.И., Шпигун Л.К. Состав и антиоксидантные свойства экстрактов из листьев голубики высокорослой (*Vaccinium corymbosum* L.) // Химия растительного сырья. – 2019. – № 4. – С. 223-232. – <https://doi.org/10.14258/jcrpm.2019045498>.
8. Макаров С.С., Кузнецова И.Б. Клональное микроразмножение голубики полуввысокой на этапах «введение в культуру» и «собственно микроразмножение» // Агротомия. – 2019. – № 3(56). – С. 28-32. – <https://doi.org/10.34655/bgsha.2019.56.3.004>.
9. Молканова О.И., Королёва О.В., Стахеева Т.С., Крахмалева И.Л., Мелещук Е.А. Совершенствование технологии клонального микроразмножения ценных плодовых и ягодных культур для производственных условий // Достижения науки и техники АПК. – 2018. – Т. 32. – № 9. – С. 66-69. – <https://doi.org/10.24411/0235-2451-2018-10915>.
10. Нечаева Т.Л., Николаева Т.Н., Загоскина Н.В. Влияние салициловой и оксibenзойной кислот на *in vitro* культуры чайного растения и накопление в них фенольных соединений // Известия РАН. Серия биологическая. – 2020. – № 4. – С. 1-8. – <https://doi.org/10.31857/S0002332920040098>.
11. Николаева Т.Н., Лапшин П.В., Загоскина Н.В. Метод определения суммарного содержания фенольных соединений в растительных экстрактах с реактивом Фолина-Дениса и реактивом Фолина-Чокальтеу: модификация и сравнение // Химия растительного сырья. – 2021. – № 2. – С. 291-299. – <https://doi.org/10.14258/jcrpm.2021028250>.
12. Рупасова Ж.А., Яковлев А.П., Лиштван И.И., Василевская Т.И., Варавина Н.П., Криницкая Н.Б. Влияние макро- и микроудобрений на биохимический состав плодов *Vaccinium* L. на торфяной выработке в Беларуси // Бюллетень главного ботанического сада. – 2012. – № 4. – С. 53-57. – ISSN 0366-502X.
13. Стахеева Т.С., Васильева О.Г., Коновалова Л.Н. Сохранение биологического разнообразия растений в генобанке *in vitro* ГБС РАН на примере семейства Ericaceae // X международная конференция по экологической морфологии растений, посвященная памяти И.Г. и Т.И. Серебряковых: мат. X междун. конф., Москва, 27-30 ноября 2019 г. – М. : МПГУ, 2019. – С. 73-77. – ISBN 978-5-4263-0848-0.
14. Стахеева Т.С., Молканова О.И., Коновалова Л.Н. Некоторые аспекты размножения *in vitro* перспективных сортов высокой и полуввысокой голубики // Плодоводство и ягодоводство России. – 2017. – Т. 48. – № 2. – С. 279-285. – ISSN 2073-4948.
15. Belscak-Cvitanovi A., Durgo K., Hudek A., Bacun-Druzina V., Komes D. Overview of polyphenols and their properties / ed. Galanakis C.M. // Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications. Duxford. – UK: Woodhead Publ. – 2018. – P. 3-44. – <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813572-3.00001-4>.
16. Debnath S.C., Goyal J.C. *In vitro* propagation and variation of antioxidant properties in micropropagated *Vaccinium berry* plants – A review // Molecules. – 2020. – Vol. 25. – N. 788. – <https://doi.org/10.3390/molecules25040788>.
17. Georgieva M., Kondakova V. *In vitro* propagation of *Vaccinium corymbosum* L. // Bulgarian J. Agricultural Science. – 2021. – Vol. 27. – № 2. – P. 323-327. – ISSN 1310-0351.
18. Giacalone M., Di Sacco F., Traupe I., Topini R., Forfori F., Giunta F. Antioxidant and neuroprotective properties of blueberry polyphenols: a critical review // Nutr. Neurosci. – 2011. – Vol. 14. – P. 119-125. – <https://doi.org/10.1179/1476830511Y.0000000007>.
19. Goyal J.C., Igamberdiev A.U., Debnath S.C. Morphology, phenolic content and antioxidant capacity of lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) plants as affected by *in vitro* and ex vitro propagation methods // Can. J. Plant Sci. – 2013. – Vol. 93. – P. 1001-1008. – <https://doi.org/10.4141/CJPS2012-307>.



20. Lattanzio V. Relationship of phenolic metabolism to growth in plant and cell cultures under stress // Plant cell and tissue differentiation and secondary metabolites. Ramawat K. G. et al. (eds.). Switzerland: Springer. – 2021. – P. 837-868. – [https://doi.org/10.1007/978-3-030-30185-9\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-30185-9_8).
21. Nile S.H., Park S.W. Edible berries: Bioactive components and their effect on human health // Nutrition. – 2014. – Vol. 30. – P. 134-144. – <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.04.007>.
22. Nosov A.M. Application of cell technologies for production of plant-derived bioactive substances of plant origin // Appl. Biochem. Microbiol. – 2012. – Vol. 48. – № 7. – P. 609-624. – <https://doi.org/10.1134/S000368381107009X>.
23. Skrovankova S., Sumczynski D., Mlcek J., Jurikova T., Sochor J. Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries // Int. J. Mol. Sci. – 2015. – Vol. 16. – P. 24673-24706. – <https://doi.org/10.3390/ijms161024673>.
24. Zuk M., Szperlik J., Hnitecka A., Szopa J. Temporal biosynthesis of flavone constituents in flax growth stages // Plant Physiology and Biochemistry. – 2019. – Vol. 42. – P. 234-245. – <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.07.009/>

**BLUEBERRIES *IN VITRO*:  
MICROPROPAGATION, MORPHOMETRY, CONTENT  
OF PHENOLIC BIOANTIOXIDANTS**

**Nechayeva T.L.<sup>1</sup>, Zubova M.Yu.<sup>1</sup>, Stakheyeva T.S.<sup>2</sup>, Vasilieva O.G.<sup>2</sup>,  
Konovalova L.N.<sup>2</sup>, Zagoskina N.V.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> K.A. Timiryazev Institute  
of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences

<sup>2</sup> N.V. Tsitsin Main Botanical Garden  
of the Russian Academy of Sciences Moscow

Russia, e-mail: NechaevaTatyana.07@yandex.ru

Micropropagation, morphometric parameters and accumulation of phenolic compounds, including flavonoids, have been studied in *in vitro* blueberry micro-shoots ('North Country' and 'Bluecrop' cultivars). A higher micropropagation rate of the 'North Country' cultivar has been established in comparison with the 'Bluecrop' cultivar. Differences in the number and size of their leaves are shown. There was an increase in the growth of micro-shoots of the 'North Country' cultivar from 36th to 56th day of cultivation (by 15 %), which is not typical for the 'Bluecrop' cultivar, where the level of increase did not change. The content of phenolic compounds in *in vitro* micro-shoots of the 'Bluecrop' cultivar on the 36th day of growth exceeded that of the 56th day by 30 %, and of flavonoids – by 20 %, respectively. In micro-shoots of the 'North Country' cultivar, the amount of these secondary metabolites remained at the same level throughout the passage.

**Key words:** blueberry, *Vaccinium* L., clonal micropropagation, growth, phenolic compounds, flavonoids.