

УДК 581.1

doi: 10.31360/2225-3068-2019-69-150-156

**О СОХРАНЕНИИ СПЕЦИФИКИ
НАКОПЛЕНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
В ИНИЦИИРОВАННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНОВ ЧАЯ
(*CAMELLIA SINENSIS* (L.) O. KUNTZE)
КУЛЬТУРАХ *IN VITRO***

Нечаева Т. Л., Зубова М. Ю., Загоскина Н. В.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук,
г. Москва, Россия, e-mail: Nechaevatyana.07@yandex.ru*

Исследованы морфофизиологические характеристики каллусных культур, инициированных из листьев (ЧЛ), стеблей (ЧС) и корней (ЧК) чайного растения (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, грузинская разновидность) и накопление в них фенольных соединений (ФС). Показали значительное сходство морфофизиологических параметров каллусных культур. Наибольшее содержание ФС отмечено в каллусах ЧС, тогда как в ЧЛ и ЧК оно было ниже на 30 % и 50 %, соответственно. Делается вывод о том, что каллусные культуры, инициированные из различных органов чайного растения, в определенной степени сохраняли специфику фенольного метаболизма исходных эксплантов.

Ключевые слова: *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, культуры *in vitro*, фенольные соединения.

Чай принадлежит к семейству *Theacea*, роду *Camellia* и представлен одним видом – *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. Различают две его разновидности – китайскую (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) и ассамскую (*Camellia sinensis* var. *assamica*) для которых характерны морфометрические и физиологические отличия [1]. *Camellia sinensis* var. *sinensis* представляет собой небольшой кустарник с полураскидистой кроной и удлинёнными листьями, тогда как *Camellia sinensis* var. *assamica* – это высокие деревья с раскидистой кроной и овальными листьями с волнистыми краями [17].

Camellia sinensis L. является очень древней культурой, насчитывающей более чем 4 000-летнюю историю. Из его листьев получают один

из самых популярных в мире и широко потребляемых напитков, обладающий не только приятным вкусом и ароматом, но и целебными свойствами. Он оказывает стимулирующее действие на нервную систему, снижает риск развития сахарного диабета, инсульта, сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний [18–20].

Родиной чая считают юго-западные районы Китая, верхней Бирмы и северного Индокитая. Именно на этих территориях обнаружены древние естественно растущие его массивы, распространившиеся на север и юг Азии [23]. В настоящее время зона произрастания чая значительно расширилась. Его промышленное выращивание осуществляется в странах Южной Америки, Африки, Азии, Ближнего Востока и площади возделывания неуклонно растут [11]. Наиболее крупными производителями чая в мире являются Китай, Индия, Шри-Ланка и Кения [15]. В России находятся самые северные плантации чая, которые расположены в предгорных районах Северо-Западного Кавказа и на Черноморском побережье Краснодарского края [9].

Для растений *Camellia sinensis* L. характерен специализированный обмен, направленный на образование различных соединений фенольной природы (ФС), содержание и состав которых зависят от условий произрастания, времени сбора, условий хранения [5, 10]. Наибольшее их накопление характерно для листьев молодых побегов, чуть ниже оно в стеблевых тканях и наименьшее – в корнях [4].

Основными компонентами фенольного комплекса листьев чайного растения являются соединения флавановой природы, а именно, мономерные флаван-3-олы (катехины) и их олигомерные производные – проантоцианидины [3]. Флаван-3-олы представлены (+)-катехином, (–)-эпикатехином, (+)-галлокатехином и (–)-эпигаллокатехином, а также их галлированными формами [16]. Среди проантоцианидинов преобладает В-тип с различной степенью полимеризации [14].

Помимо флаванов в листьях чая присутствуют флавонолы, представленные производными кверцетина и кемпферола [12].

Сообщалось об образовании небольших количеств галловой, эллаговой, хлорогеновой, изохлорогеновой, хинной и производных гидроксикоричной кислоты [16].

Кроме того, в чае содержится кофеин, теобромин, теофиллин, таннин, эфирные масла и различные витамины. Все это свидетельствует о наличии в этом растении чрезвычайно разнообразного комплекса вторичных метаболитов с высокой биологической активностью, что и обуславливает его ценные пищевые и фармакологические свойства [13].

В последние десятилетия все большее значение приобретает использование методов биотехнологии, в том числе и для получения биологически активных соединений растительного происхождения, к числу которых можно отнести полифенолы чайного растения. Ранее проведённые исследования показали, что *in vitro*-культуры чайного растения (каллусная, суспензионная) сохраняют способность к биосинтезу ФС [1]. Однако их количество и состав беднее, чем в тканях интактного растения, как это характерно для большинства культур *in vitro* [8].

В то же время, в некоторых зарубежных работах упоминается, что введение растения чая в культуру *in vitro* не приводило к упрощению состава ФС [16]. В каллусной культуре чая, полученной в лаборатории биотехнологии и биохимии чая в Китае, сохранялась способность к синтезу катехинов, в том числе их галлированных производных – эпигаллокатехин-галлата и эпикатехин-галлата, хотя их количество в клетках уменьшалось [22].

Целью исследования являлось сравнение суммарного содержания фенольных соединений в каллусных культурах, инициированных из разных органов растений чая.

Объекты и методы. Объектом исследования служили каллусные культуры, инициированные из листьев (ЧЛ), стеблей (ЧС) и корней (ЧК) чайного растения (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, грузинская разновидность). Каллусы выращивали в темноте на модифицированной питательной среде Хеллера, содержащей глюкозу (2,5 %) и 2,4-Д (5 мг/л). Длительность пассажа составляла 42 дня. При проведении исследований использовали культуру 30-дневного возраста [6].

Оценивали морфофизиологические характеристики каллусов и определяли их оводнённость (высушивание при 70 °С до постоянной массы) [7]. ФС извлекали из растительного материала 96%-ным этанолом. В экстрактах спектрофотометрическим методом определяли суммарное содержание ФС с реактивом Фолина-Дениса [2]. Калибровочную кривую строили по (-) эпикатехину.

Исследования проводили в трёх биологических и двух аналитических повторностях. Все результаты статистически обрабатывали в программе Excel. На графике представлены средние значения и их стандартные ошибки.

Результаты и их обсуждение. Гетеротрофные каллусные культуры чайного растения, инициированные из стебля, листа и корня, представляли собой медленно растущие плотные каллусы бежевого цвета (рис. 1). К концу пассажа они приобретали бежевый цвет.



Рис. 1. Внешний вид каллусов чайного растения, инициированных из листа (ЧЛ), стебля (ЧС) и корня (ЧК).
Возраст культур – 30 дней

По морфофизиологическим характеристикам культуры были достаточно близки друг к другу, хотя для ЧК отмечалась большая плотность каллусной массы, по сравнению с двумя другими линиями. При этом ярко выраженных различий в оводнённости культур не отмечалось. Во всех вариантах она составляла 92–94 %.

Важным показателем биосинтетической способности клеток и тканей растений является суммарное содержание ФС [6]. Наиболее высокий его уровень отмечен в каллусной культуре ЧС (рис. 2). В культурах ЧЛ и ЧК он был ниже на 30 % и 50 %, соответственно. Следовательно, несмотря на достаточно близкие морфофизиологические характеристики каллусных культур, инициированных из различных органов чая, они отличались по способности к биосинтезу фенольных соединений.

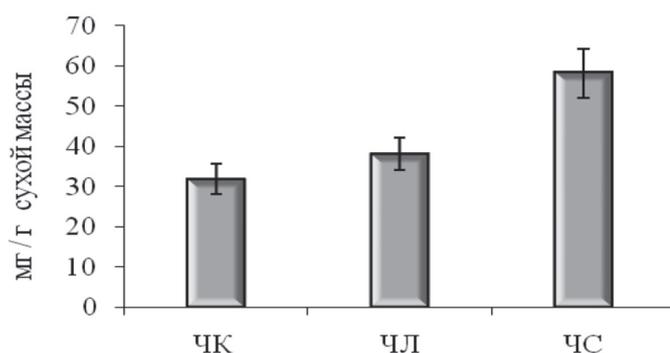


Рис. 2. Содержание суммы фенольных соединений в каллусных культурах, инициированных из стебля (ЧС), листа (ЧЛ) и корня (ЧК) чайного растения

Заключение. Каллусные культуры, инициированные из различных органов чайного растения, в определенной степени сохраняли специфику фенольного метаболизма исходных эксплантов. Наиболее ярко это проявлялось в культуре ЧК, для которой характерен самый низкий уровень накопления ФС, что отмечалось и для интактного растения [3]. Более высокое их содержание было в культуре ЧЛ и, особенно, ЧС. Значительное накопление ФС в каллусе стеблевого происхождения может найти практическое применение для получения этих фармакологически ценных биологически активных веществ.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ (19-416-230049 p_a)

Библиографический список

1. Загоскина Н.В., Дубравина Г.А., Запрометов М.Н. Особенности формирования хлоропластов и накопления фенольных соединений в фотомиксотрофных каллусных культурах чайного растения // Физиология растений. – 2000. – Т. 47. – № 4. – С. 537-543. – ISSN 0015-3303.
2. Загоскина Н.В., Нечаева Т.Л., Николаева Т.Н., Лапшин П.В., Гончарук Е.А. Углеводы питательной среды и их влияние на каллусные культуры чайного растения (*Camellia sinensis* L.) // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия Естественные науки. – 2016. – № 5(246). – Вып. 37. – С. 45-55. – ISSN 2075-4671.
3. Запрометов М.Н. Биохимия катехинов. – М: Наука, 1964. – 200 с.
4. Запрометов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. – М.: Наука, 1993. – 272 с. – ISBN 5-02-004141-6.
5. Малюкова Л.С. Микроэлементы в системе «почва-чайное растение» в условиях субтропиков России: монография. – Сочи: ВНИИЦиСК, 2011. – 114 с. – ISBN 978-5-904533-13-7.
6. Николаева Т.Н., Загоскина Н.В., Запрометов М.Н. Образование фенольных соединений в каллусных культурах чайного растения под действием 2,4-Д и НУК // Физиология растений. – 2009. – Т. 56. – № 1. – С. 53-58. – ISSN 0015-3303.
7. Носов А.М. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. М.: БИОНОМ. – 2011. – С. 386-403. – ISBN 978-5-9963-0738-8.
8. Носов А.М. Вторичный метаболизм // Физиология растений. – 2005. – С. 588. – ISSN 0015-3303.
9. Платонова Н.Б., Белоус О.Г. Краткая история интродукции и развития чаеводства в России // Sciences of Europe. – 2016. – № 2-2. – С. 91-95. – ISSN 3162-2364.
10. Ahmed S., Stepp J.R., Orians C., Griffin T., Matyas C., Robbat A., Buckley S. Effects of extreme climate events on tea (*Camellia sinensis*) functional quality validate indigenous farmer knowledge and sensory preferences in tropical China // PloS One. – 2014. – Vol. 9. – Issue 10. – P. e109126.
11. Basu Majumder A., Bera B., Rajan A. Tea statistics: global scenario // Inc. J. Tea Sci. – 2010. – Vol. 8. – Issue 1. – С. 121-4.

12. Del Rio D., Stewart A.J., Mullen W., Burns J., Lean M.E., Brighenti F., Crozier AH. PLC-MSn analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea // Journal of agricultural and food chemistry. – 2004. – Vol. 52. – Issue 10. – P. 2807-2815. – ISSN 0021-8561.
13. Eungwanichayapant P.D., Popluechai S. Accumulation of catechins in tea in relation to accumulation of mRNA from genes involved in catechin biosynthesis // Plant Physiology and Biochemistry. – 2009. – Vol. 47. – Issue 2. – P. 94-97. – ISSN: 0981-9428.
14. Fraser K., Harrison S.J., Lane G.A., Otter D.E., Hemar Y., Quek S. Y., Rasmussen S. HPLC–MS/MS profiling of proanthocyanidins in teas: a comparative study // Journal of Food Composition and Analysis. – 2012. – Vol. 26. – Issue 1-2. – P. 43-51. – ISSN 0889-1575.
15. Gunathilaka R.P.D., Tularam G.A. The tea industry and a review of its price modelling in major tea producing countries // Journal of Management and Strategy. – 2016. – Vol. 7. – Issue 1. – P. 21-36. – ISSN 1923-3965.
16. Jiang X., Liu Y., Li W., Zhao L., Meng F., Wang Y., Gao L. Tissue-specific, development-dependent phenolic compounds accumulation profile and gene expression pattern in tea plant [*Camellia sinensis*] // PLoS One. – 2013. – Vol. 8. – Issue 4. – P. e62315.
17. Kottawa-Arachchi J.D., Gunasekare M.T.K., Ranatunga M.A.B. Biochemical diversity of global tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] germplasm and its exploitation: a review // Genetic Resources and Crop Evolution. – P. 1-15. – ISSN 0925-9864.
18. Kuzuhara T., Suganuma M., Fujiki H. Green tea catechin as a chemical chaperone in cancer prevention // Cancer letters. – 2008. – Vol. 261. – Issue 1. – P. 12-20. – ISSN 0304-3835.
19. Rodriguez-Mateos A., Vauzour D., Krueger C.G., Shanmuganayagam D., Reed J., Calani L., Crozier A. Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update // Archives of toxicology. – 2014. – Vol. 88. – Issue 10. – P. 1803-1853. – ISSN 0340-5761.
20. Ruxton C. Emerging evidence for tea benefits // Nutrition Bulletin. – 2013. – Vol. 38. – Issue 3. – P. 287-301.
21. Wachira F.N., Kamunya S., Karori S., Chalo R., Maritim T. The tea plants botanical aspects V. Preedy (Ed.) // Tea in health and disease prevention. Chapter 1. – London: Academic Press, 2012. – P. 3-17.
22. Wang Y. S., Gao L., Shan Y., Liu Y., Tian Y., Xia T. The influence of light on the biosynthesis of catechins in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) // Sci. Hortic. – 2012. – Vol. 133. – P. 72-83. – ISSN 1611-4426.
23. Xiao P.G., Li Z.Y. Botanical classification of tea plants // Tea: Bioactivity and Therapeutic Potential. Medicinal and Aromatic Plants–Industrial Profiles. Taylor and Francis, London. – 2002. – P. 17-34.

**PRESERVATION OF SPECIFICITY
OF PHENOLIC COMPOUNDS ACCUMULATION
IN *IN VITRO* CULTURES INITIATED FROM VARIOUS
TEA PLANT ORGANS (*CAMELLIA SINENSIS* (L.) O. KUNTZE)**

Nechayeva T. L., Zubova M. Yu., Zagoskina N. V.

*Federal State Budgetary Scientific Institution
Institute of Plants Physiology named after K. A. Timiryazev of the Russian Science Academy,
c. Moscow, Russia, e-mail: Nechaevatatyana.07@yandex.ru*

Morphophysiological characteristics of callus cultures initiated from leaves (TL), stems (TS), and roots (TR) of tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, Georgian diversity) and the total content of phenolic compounds (PC) were studied. It was shown that the morphophysiological parameters of the studied lines were quite close to each other. At the same time, the highest PC level was observed in the callus culture of the TS, whereas in the TL and TR cultures it was lower by 30 % and 50 %, respectively. It was established that callus cultures, initiated from various organs of tea plant, retained to a certain extent the phenolic metabolism specificity of the initial explants.

Key words: *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, *in vitro*-cultures, phenolic compounds.