

# СИНТЕТИЧЕСКИЕ РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА: РОЛЬ В МИКРОКЛОНАЛЬНОМ РАЗМНОЖЕНИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ *DIOSCOREA NIPPONICA* MAKINO, ОБРАЗОВАНИИ И ЛОКАЛИЗАЦИИ ПОЛИФЕНОЛОВ

**Е.А. Калашникова**

д.б.н., профессор,  
кафедра генетики, селекции и биотехнологии,  
Государственный аграрный университет МСХА имени К.А. Тимирязева (Москва)  
E-mail: Kalash0407@mail.ru

**Зайцева С.М.**

к.б.н., доцент,  
кафедра кормления и кормопроизводства,  
Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина (Москва)  
E-mail: Smzaytseva@yandex.ru

**Доан Тху Тхуи**

к.б.н., доцент,  
агронимический факультет, Вьетнамский национальный аграрный университет (Республика Вьетнам, г. Ханой)  
E-mail: doanthuycgct@gmail.com

**Р.Н. Киракосян**

к.б.н., доцент,  
кафедра генетики, селекции и биотехнологии,  
Государственный аграрный университет МСХА имени К.А. Тимирязева (Москва)  
E-mail: Mia4129@mail.ru

**Актуальность работы.** Благодаря клональному микроразмножению стало возможно сохранять исчезающие лекарственные растения, создавая генетические банки *in vitro*. Полученные в кратчайшие сроки растения-регенеранты, генетически идентичные исходному интактному растению, могут рассматриваться как потенциальные источники вторичных метаболитов – ценных биологически активных веществ, широко применяемых в фармацевтической промышленности.

**Цель** исследования – изучение влияния гормонального состава питательной среды на микроразмножение растений *Dioscorea nipponica* Makino, а также на процессы образования и локализации фенольных соединений в растениях-регенерантах, размноженных в условиях *in vitro*.

**Материал и методы.** Объектом исследования служили интактные растения *Dioscorea nipponica* Makino и полученные на их основе микроклоны. Для индукции образования пазушных побегов, адвентивных почек и микроклубней первичные экспланты культивировали на питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи Мурасига и Скуга, а также различные вещества с цитокининовой и ауксиновой активностью, при температуре 24 °С и 16-часовом фотопериоде. Для укоренения микропобегов использовали модифицированную среду, содержащую 1/2 нормы макросолей, 20 г/л сахарозы, 7 г/л агара, а также ИУК в концентрации 1 мг/л. Адаптацию растений проводили в контейнерах, содержащих проавтоклавированный субстрат. В спиртовых растительных экстрактах спектрофотометрическим методом определяли содержание суммы растворимых фенольных соединений (с реактивом Фолина–Дениса), флаванов (с ванилиновым реактивом) и флавонолов (с хлористым алюминием). Локализацию полифенолов определяли гистохимическими методами (0,08%-ным раствором реактива Fast Blue, реакция с ванилиновым реактивом в парах соляной кислоты).

**Результаты.** Получены микроклоны лекарственных растений, обладающие высокой биосинтетической способностью к образованию полифенолов (флаванов и флавонолов), которые характеризовались интенсивным ростом, формированием мощной биомассы и адвентивных корней. Флаваны являлись мажорными компонентами фенольного комплекса растений-регенерантов.

**Выводы.** В условиях *in vitro* сохраняется видоспецифичная способность к синтезу фенольных соединений. В образовании биофлавоноидов наблюдается органоспецифичность, которая в менее выраженной степени сохраняется и в условиях *in vitro*. Выявлено, что интенсивность окрашивания тканей микроклонов была несколько ниже, что согласуется с данными по количественному содержанию в них полифенолов. Синтетические регуляторы роста с цитокининовой активностью (особенно препарат Дропп) оказывают яркое стимулирующее влияние не только на процесс клонального микроразмножения, но и на биосинтетическую активность в отношении веществ фенольной природы. Биохимические данные находят подтверждение при гистохимических исследованиях.

**Ключевые слова:** фенольные соединения, флаваны, флавонолы, локализация, диоскорея ниппонская, микроклоны.

**Для цитирования:** Калашникова Е.А., Зайцева С.М., Доан Тху Тхуи, Киракосян Р.Н. Синтетические регуляторы роста: роль в микроразмножении лекарственных растений *Dioscorea nipponica* Makino, образовании и локализации полифенолов. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2020; 23(1): 42–50. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-01-07>

В настоящее время остро стоит проблема сохранения биоразнообразия растений. Клональное микроразмножение позволяет сохранять ценные лекарственные и исчезающие растения. Благодаря этому перспективному направлению биотехнологии, создание генетических банков *in vitro*, дает возможность получать в кратчайшие сроки растения-регенеранты генетически идентичные исходному интактному растению, численность которого мала или находится на грани полного исчезновения.

Кроме того, растения-регенеранты могут рассматриваться как потенциальные источники вторичных метаболитов – ценных биологически активных веществ, широко применяемых в фармацевтической промышленности. Культивируя дифференцированные и дедифференцированные (каллусные) клетки растений в строго контролируемых условиях *in vitro*, но при определенных модификациях питательной среды и внешних условий выращивания, возможно добиться целевой направленности в продуцировании этими клетками определенных веществ вторичного метаболизма [1]. Экспериментально установлено, что не только каллусные культуры, но и микроклоны сохраняют способность к синтезу вторичных соединений, в том числе и фенольной природы, которые характерны для интактных растений [2]. Данное физиологическое свойство является базовой основой для использования клеточных культур *in vitro* и микроклонов при проведении исследований в качестве модельных объектов [3].

Одной из перспективных и интересных культур для изучения вторичного метаболизма, как в интактном растении *in vivo*, так и в культуре *in vitro* является диоскорея ниппонская (*Dioscorea nipponica* Makino). Особенности вторичного метаболизма и способность к образованию веществ фенольной природы обуславливают широкое терапевтическое действие экстрактивных веществ диоскореи [4]. Растение обладает противоопухолевым, иммуномодулирующим и дерматотоническим действием, снижает содержание холестерина в крови, расширяет периферические сосуды, углубляет дыхание, улучшает проведение импульсов к сердцу по блуждающему нерву [5].

Широкое применение полифенолов в фармакологии основано на их способности к окислению с образованием хиновых форм, что обуславливает их гепатопротекторные, нейрорегуляторные, капилляроукрепляющие, желчегонные и противо-

опухолевые свойства [6]. Однако данных об образовании фенольных соединений в растениях рода *Dioscorea* немного, а сложность физиолого-биохимических процессов, происходящих в растениях диоскореи, в том числе и в условиях *in vitro*, остается еще недостаточно изученной.

Цель исследования – изучение влияния гормонального состава питательной среды на микроклональное размножение растений *Dioscorea nipponica* Makino, а также на процессы образования и локализации фенольных соединений в клетках и тканях микроклонных растений, размноженных в условиях *in vitro*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили растения диоскореи ниппонской (*Dioscorea nipponica* Makino) произрастающие в природных условиях и пересаженные на участок редких и исчезающих растений Главного ботанического сада РАН (Москва). В качестве эксплантов использовали боковые и верхушечные почки, листовые пластинки, многолетние клубни и семена.

Для индукции образования пазушных побегов, адвентивных почек и микроклубней первичные экспланты культивировали на питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи Мурасига и Скуга, а также различные вещества с цитокининовой и ауксиновой активностью. В качестве цитокининов изучали влияние БАП, 2ip, кинетина в концентрациях от 0,5 до 1,0 мг/л, а также препараты Дропп и Цитодеф в концентрациях 0,01–1,0 мг/л. Из веществ с ауксиновой активностью исследовали влияние НУК (0,5–1,0 мг/л), ИМК (1–7 мг/л) и ИУК (1–7 мг/л). Экспланты выращивали при температуре 24 °С и 16-часовом фотопериоде. Для укоренения микропобегов использовали модифицированную среду Мурасига и Скуга, содержащую 1/2 нормы макросолей, 20 г/л сахарозы, 7 г/л агара, а также ИУК в концентрации 1 мг/л. Адаптацию растений проводили в контейнерах, содержащих проавтоклавированный субстрат.

Для извлечения фенольных соединений растительный материал измельчали, а затем подвергали экстракции горячим 96%-ным этанолом. В экстрактах спектрофотометрическим методом определяли содержание суммы растворимых фенольных соединений (с реактивом Фолина–Дениса), флаванов (с ванилиновым реактивом) и флавонолов (с хлористым алюминием). Калибровоч-

ные кривые для определения суммарного содержания растворимых фенольных соединений и флаванов строили по (-)-эпикатехину, для определения флавонолов – по рутину [7]. В таблицах представлены средние арифметические значения из трех биологических параллельных и их стандартные отклонения.

Для гистохимического анализа в качестве объектов исследования использовали листья, побеги, корни и клубни интактных растений, а также микропобеги и микроклубни, полученные *in vitro*. Растительный материал резали при помощи микротома-криостата, толщина среза составляла 25 мкм. Локализацию фенольных соединений определяли гистохимическими методами: на сумму фенольных соединений материал окрашивали 0,08%-ным раствором реактива FastBlue 6 [8]; для изучения локализации флаванов (катехины и проантоцианидины) использовали реакцию с ванилиновым реактивом в парах соляной кислоты, а для лигнина – окрашивание флорглоцином в серной кислоте. С целью сохранения внутриклеточного распределения фенольных соединений, все реакции проводили в неполярных растворителях. Препараты просматривали с помощью светового микроскопа «KarlZeiss».

Исследования проводили в пяти биологических и трех аналитических повторностях. Статистическая обработка экспериментальных данных выполнена на основе методов математической статистики. На графиках представлены средние арифметические значения с доверительными интервалами на 5%-ном уровне значимости.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Поскольку диоскорея ниппонская относится к ценным исчезающим видам и в природе имеет ограниченный ареал распространения [9], большое практическое значение приобретают работы по клональному микроразмножению, а также по изучению фенольного метаболизма этих растений *in vitro* и *in vivo*.

На первых этапах исследований необходимо установить особенности накопления соединений фенольной природы (в частности, суммы растворимых фенольных соединений, флаванов и флавонолов) в различных органах интактных растений диоскореи.

Известно, что все растения способны к биосинтезу полифенолов, причем некоторые соединения простого строения, такие как фенилпропаноиды, имеют практически всеобщее распространение

[10]. Однако исследователи отмечают, что биосинтез полифенолов в растениях происходит с разной интенсивностью и зависит от ряда взаимосвязанных факторов, например, возраста исходного экспланта, типа первичного экспланта, условий выращивания интактного растения и др. [11]. Показано, что наиболее интенсивно биосинтез фенольных соединений происходит в молодых активно вегетирующих органах [12].

В наших исследованиях установлено, что изучаемые первичные экспланты (побеги, однолетние корневища, многолетние корневища), изолированные с интактных растений, обладают высокой способностью к синтезу полифенолов, где наибольшее их содержание отмечалось в корневищах. Причем в многолетних корневищах суммарное содержание растворимых фенольных соединений вдвое выше по сравнению с содержанием таковых в молодых (рис. 1). Аналогичные закономерности характерны и для флаванов, высокореакционных низкомолекулярных веществ, обладающих антиоксидантными свойствами [13]. Содержание флавонолов отмечено только в побегах. Это связано с тем, что в зеленых тканях растений флаванолы являются наиболее распространенными полифенолами, так как их биосинтез приурочен к хлоропластам [14, 15]. Полученные данные согласуются с результатами других исследователей по диоскореи кавказской (*Dioscorea caucasia* Lypsky) [16].

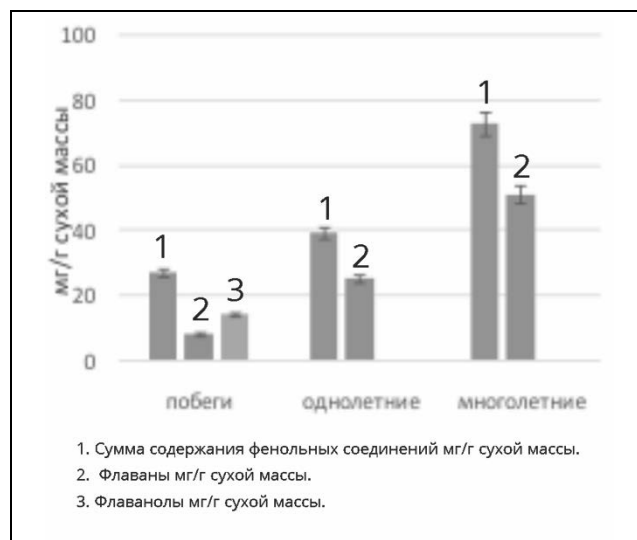


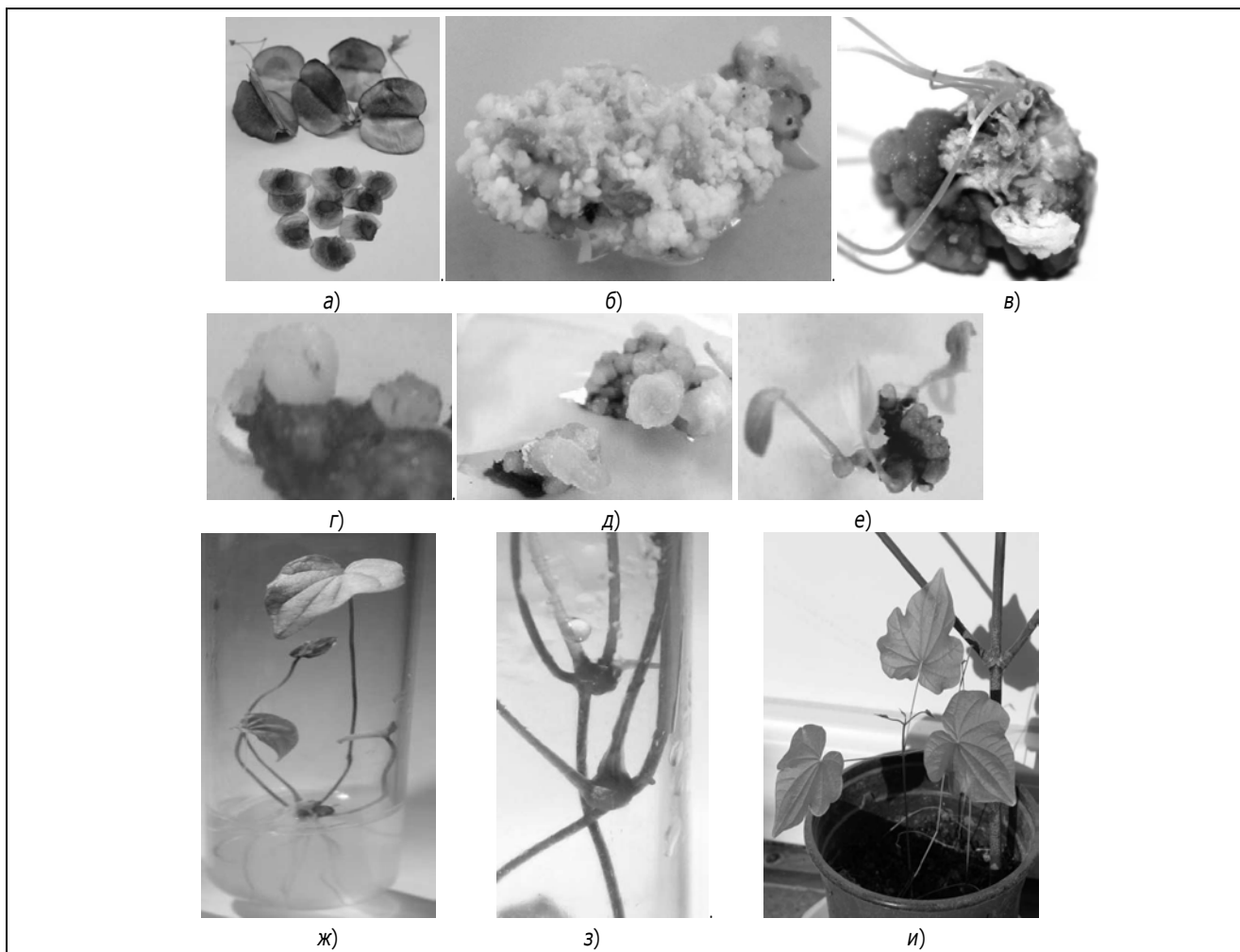
Рис. 1. Содержание растворимых фенольных соединений в интактных растениях

Таким образом, установленные различия в накоплении фенольных соединений в разных органах интактных растений диоскорей nipпонской, еще раз подтверждает, что биосинтез продуктов вторичного метаболизма характеризуется органо-специфичностью [17].

В настоящее время для диоскорей nipпонской большое практическое значение приобретает разработка технологий ее клонирования и получения каллусных и суспензионных культур *in vitro*. Это связано не только с целью сохранения исходных форм в природных условиях, но и возможностью их использования в качестве источников биологически активных веществ и лекарственных препаратов [18].

Известно, что формообразовательные процессы в условиях *in vitro* происходят при наличии в составе питательной среды биологически активных веществ, таких как регуляторы роста, аминокислоты, растительные экстракты и др. [19].

Помимо гормонального состава питательной среды процесс каллусогенеза и морфогенеза зависит от типа первичного экспланта. Так, в нашей работе каллусную ткань индуцировали из изолированных зародышей и сегментов клубней. Экспланты культивировали на питательной среде, содержащей минеральные соли по Мурасиге и Скуга, 1 г/л гидролизат казеина, 1 г/л активированного угля, 0,2 мг/л НУК, а также 1 мг/л БАП. В этих условиях каллусная ткань, полученная из изолированных зародышей, характеризовалась плотной консистенцией, имела белый или светло-желтый цвет и обладала высокой пролиферативной активностью (рис. 2,б). Причем последующий перенос ее на питательные среды, содержащие низкие концентрации гормонов (кинетин 0,1 мг/л), приводил к формированию микроклубней, из которых в дальнейшем развивались растения-регенеранты (рис. 2,в)



**Рис. 2.** Внешний вид каллусных культур диоскорей nipпонской, полученных из семян (а-в), изолированных сегментов клубней (г-е) и микроклонов, полученных на питательной среде с добавлением Дропп (0,01 мг/л) (ж); формирование микроклубней в пазухе листа (з) и адаптированные растения к нестерильным условиям выращивания (и)

При использовании в качестве первичного экспланта изолированных сегментов клубней формирование каллусной ткани происходило, как правило, в местах поранения. Каллусная ткань имела среднюю консистенцию и состояла из глобулярных структур желтого и светло-зеленого цвета. Присутствие в составе питательной среды ауксина и цитокинина стимулировало более интенсивное каллусообразование, по сравнению со средой, содержащей один ауксин (рис. 2,з-е). Применение синтетических регуляторов роста, обладающих цитокининовой активностью – Дропп и Цитодеф, приводило к изменению морфофизиологических процессов, которые проявлялись в формировании каллусной ткани в основании первичного экспланта с одновременной регенерацией растений, индукции развития меристем и в формировании микроклубней *de novo*. (рис. 2,е)

Экспериментально установлено, что для диоскорей nipпонской из всех изучаемых цитокининов наибольшей стимулирующей активностью к индуцированию образования микроклубней и побегов обладал препарат Дропп, с увеличением концентрации которого в питательной среде (с 0,01 до 1,0 мг/л во всех вариантах) коэффициент размножения увеличивался, но при этом формировались мелкие клубни и небольшие по размеру побеги. В дальнейшем полученные микропобеги переносили на среду для укоренения. В качестве ауксинов в состав питательной среды добавляли ИУК или ИМК в концентрации 1–5 мг/л. В этих условиях культивирования, полученные микроклоны характеризовались интенсивным ростом и формированием мощной надземной биомассы. Причем наиболее благоприятным ауксином для микроразмножения являлась ИМК, в то время как ИУК проявила слабый эффект на изучаемый процесс. Однако следует отметить, что на питательной среде с ИУК микропобеги были способны к укоренению и этот процесс наиболее интенсивно происходил при концентрации гормона 5 мг/л. В этих вариантах длина корневой системы была максимальной и составляла в среднем 2,7 см. Это в дальнейшем позволило микрорастениям успешно пройти адаптацию к нестерильным условиям выращивания (рис. 2,ж-и).

На последнем этапе исследований необходимо было установить зависимость содержания биофлавоноидов от типа исследуемой ткани [20]. Оно было больше в микроклубнях, по сравнению с побегами микроклонов. Полученные данные полно-

стью согласуются с результатами работы с интактными растениями *in vivo*, а также с данными других исследователей [21]. Однако следует отметить, что способность к синтезу вторичных соединений в микроклонах была ниже, чем у исходных тканей [22].

Отмеченное более низкое содержание биофлавоноидов в микроклонах диоскорей, по сравнению с исходными тканями интактных растений, которое зависело и от гормонального состава питательной среды (рис. 3).

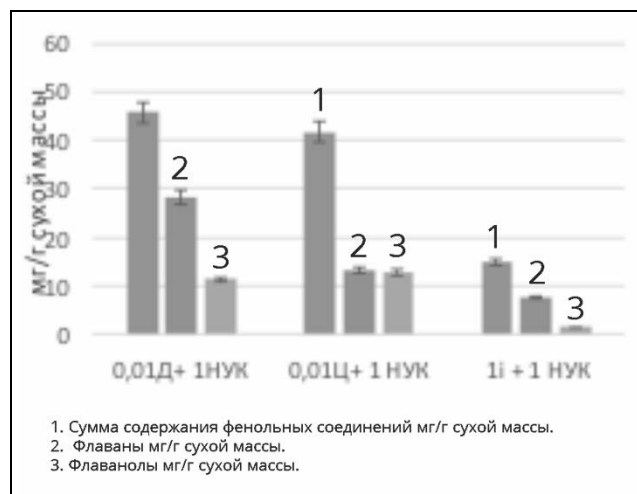


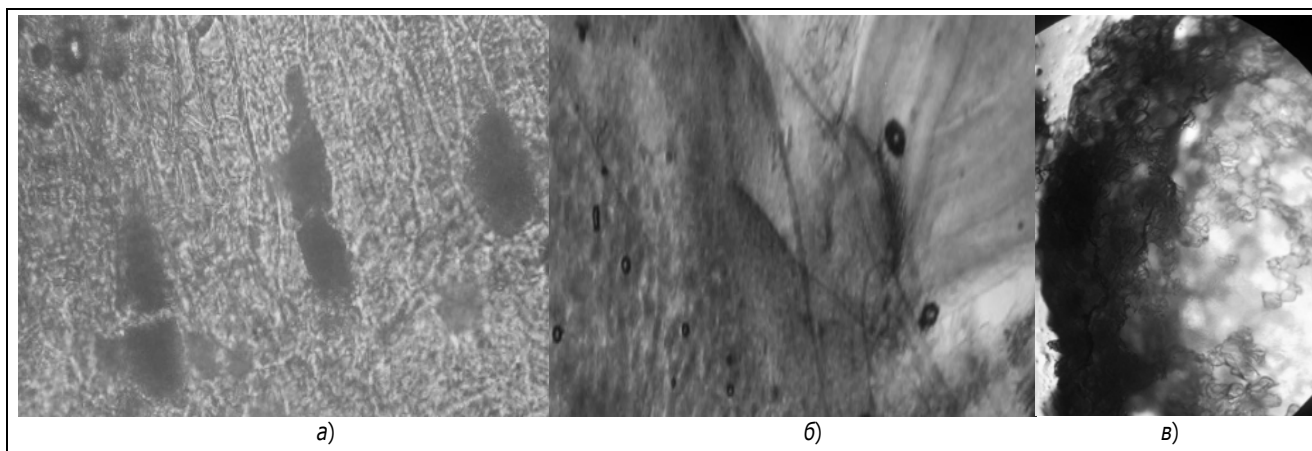
Рис. 3. Влияние гормонального состава питательной среды на содержание растворимых фенольных соединений в микроклубнях диоскорей nipпонской

Вероятно, это связано еще и с тем, что в процессе культивирования микропобегов в условиях *in vitro* наблюдается выделение полифенолов в питательную среду, что может приводить к их ингибирующему действию на ткани культивируемых эксплантов. Кроме того, многими авторами было показано, что присутствие в составе питательной среды различных регуляторов роста оказывает определенное влияние на способность изолированных клеток *in vitro* к синтезу полифенолов [23]. Наши ранние исследования показали, что существенное стимулирование биосинтеза полифенолов наблюдается в микроклонах, полученных на питательных средах содержащих препарат Дропп в концентрации 0,01 мг/л [24]. Указанная ответная реакция клеток на состав питательной среды нашла подтверждение и в наших экспериментах с микроклонами диоскорей nipпонской. Именно в этих вариантах микроклоны обладали высокой биосинтетической способностью к образованию

полифенолов, а также характеризовались интенсивным ростом, формированием мощной биомассы и адвентивных корней. Результаты согласуются с данными других исследователей, показавших, что клеточные культуры сохраняют способность к синтезу вторичных соединений, но в меньшей степени по сравнению с исходными формами [25].

Специфические гистохимические реакции позволили обнаружить у растений-регенерантов диоскореи ниппонской растворимые фенольные со-

единения, представленные флаванами и флаваноидами в эпидермальных, паренхимных и проводящих тканях. Отмечалось формирование группы клеток с полифенолами, которые были приурочены к проводящим тканям. Локализация полифенолов наблюдалась в клеточных стенках, межклетниках и в специализированных запасующих фенол эпибластах, в виде аморфного вещества или гранулированных включений различной степени агрегации (рис. 4).



**Рис. 4.** Локализация фенольных соединений в развивающейся микропочке на экспланте (а), в листке микроклона (б) и микроклубнях диоскореи ниппонской (в). Увеличение 3,2х16

В микроклубнях гистохимическая реакция на флаваны (с ванилиновым реактивом) совпала с окрашиванием на сумму растворимых фенольных соединений (реакция с FastBlue), что согласуется и с биохимическими данными, где мажорными компонентами фенольного комплекса являлись именно флаваны. Фенольные соединения локализовались в эпидермальных тканях (в клеточных стенках), а также в клетках паренхимы и в некоторых клетках первичной коры и центрального цилиндра.

При проведении гистохимических исследований 7×20 локализации растворимых фенольных соединений в микроклонах прослеживалась тенденция, которая была характерна и для интактных растений. Однако интенсивность окрашивания была несколько ниже, что согласуется с данными по количественному содержанию полифенолов в микроклонах [26].

Следовательно, можно заключить что растения диоскореи ниппонской обладают высокой способностью к биосинтезу большого числа разнообразных фенольных соединений, как простого строения, так и их полимерных форм, что несом-

ненно имеет важное практическое значение как потенциальный источник ценных биологически активных веществ для фарминдустрии. Причем в образовании биофлавоноидов наблюдается органоспецифичность, которая, в менее выраженной степени, сохраняется и в условиях *in vitro*. Синтетические регуляторы роста с цитокининовой активностью (особенно препарат Дропп) оказывают яркое стимулирующее влияние не только на процесс клонального микроразмножения, но и на биосинтетическую активность в отношении веществ фенольной природы. Биохимические данные находят подтверждение при гистохимических исследованиях. Данная локализация полифенолов в диоскореи, скорее всего, определяется их физиологическими функциями [27]. Если наличие полифенолов в надземной части диоскореи играет роль медиаторов в физиолого-биохимических процессах, а также определяет защиту растений от механических воздействий и патогенов [28], то растворимые фенольные соединения, находящиеся в корневищах, вероятно, играют роль запасных и физиологически активных веществ [29, 30].

## ВЫВОДЫ

1. Из всех изучаемых цитокининов наибольшей стимулирующей активностью к индуцированию образования микроклонов обладает препарат Дропп, с увеличением концентрации которого в питательной среде коэффициент размножения увеличивался. Микроклоны, полученные на питательных средах содержащих препарат Дропп (0,01 мг/л) обладает высокой биосинтетической способностью к образованию полифенолов, а также характеризовались интенсивным ростом, формированием мощной биомассы и адвентивных корней.
2. В условиях *in vitro* сохраняется присущая интактным растениям диоскореи биосинтетическая способность к образованию различных классов полифенолов, но в менее выраженной степени, следовательно, можно судить об определенной конститутивности фенольного метаболизма растений диоскореи. Возможно, это связано с тем, что синтез многих вторичных соединений приурочен к специализированным дифференцированным тканям. Видимо, изменение внутренней организации тканей микроклонов в условиях *in vitro* влияет на образование вторичных соединений.
3. Сохранение высокой биосинтетической способности тканями исследуемых растений в условиях *in vitro* позволяет относить растения-регенеранты не только к удобной модели для изучения вторичного метаболизма, но и к потенциальным источникам ценных биологически активных веществ для фарминдустрии [11].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Носов А.М. Регуляция синтеза вторичных соединений в культуре клеток растений. Биология культивируемых клеток и биотехнология растений / Под ред. П.Г. Бутенко. М.: Наука, 1991.
2. Takeda H, Kotake T. Expression and function of cell wall-bound cationic peroxidase in *Asparagus* somatic embryogenesis. Plant physiology preview. 2003; 131:1765–1774.
3. Manorma Sharma, Archana Sharma, Ashwani Kumar, Saikat Kumar Basu Enhancement of Secondary Metabolites in Cultured Plant Cells Through Stress Stimulus. American Journal of Plant Physiology. 2011; 6(2):50–71.
4. Hodeba D, Mignouna Mathew M. Abang Robert Asiedu R. Geeta. Culturing Meristematic Tissue and Node Cuttings from Yams (*Dioscorea*). Cold Spring Harbor Protocols 2009 (11):pdb.prot5325, November 2009 with 28 Reads DOI: 10.1101/pdb.prot5325.
5. Алексеева Г.М., Белодубровская Г.А., Блинова К.Ф., Гончаров М.Ю. Фармакогнозия. Лекарственное сырье растений и животного происхождения / Под ред. Г.П. Яковлева. СПб: СпецЛит, 2013.
6. Тюкавкина Н.А. Биофлавоноиды. М.: Издательский дом «Русский врач», 2002. 56 с.
7. Запрометов М. Н. Фенольные соединения и методы их исследования. Биохимические методы в физиологии растений. М.: Наука, 1971. С. 185–197.
8. Soukupova J., Cvikrova M., Albrechtova J. Histochemical and Biochemical Approaches to the Study of Phenolic Compounds and Peroxidases in Needles of Norway Spruce (*Piceaabies*). New Phytol. 2000; 146:403–414.
9. Y-M Zhao, Y-Y Hong, Y-F Zhou, B-C Wu. Pollination biological character of *Dioscorea nipponica* subsp. Rosthornii. Journal of Plant Resources and Environment. 2008; 17(2):15–21.
10. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и их роль в жизни растения. LVI Тимирязевские чтения. М.: Наука, 1996. 45 с.
11. Jaakola L., Hohtola A. Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants. Plant, cell and Environment. 2010; 33(8):1238–1247.
12. Santiago L., Louro R. Compartmentation of phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase in leaves of *Phyllanthus tenellus* and their induction by copper sulphate. Annals of botany. 2000; 86:1023–1032.
13. Laurent Laplaze, Hassen Gherbi, Thierry Frutz, Katharina Pawlowski, Claudine Franche, Jean-Jacques Macheix, Florence Auguy, Didier Bogusz, and Emile Duhoux. Flavan-Containing Cells Delimit Frankia-Infected Compartments in *Casuarina glauca* Nodules. Plant Physiology. 1999; 121:113–122.
14. Запрометов М.Н. Николаева Т.Н. Способность изолированных хлоропластов из листьев фасоли осуществлять биосинтез фенольных соединений. Физиология растений. 2003; 50(5):699–702.
15. Giovanni Fgati, Elisa Azzarello, Susanna Polastri, Massimiliano Tattini. Flavonoids as antioxidants: Localisation and functional significance. Plant Science. 2012; 196:67–76.
16. Доан Тху Тхуи, Калашикова Е.А., Зайцева С.М., Киракосян Р.Н. Фенольные соединения растений Диоскореи кавказской (*Dioscorea caucasica* Lipsky), особенности их образования и локализации. Естественные и технические науки. 2018; 2:24–27.
17. Chattopadhyay S.K. Studies on the Himalayan yew *Taxus wallichiana*. Part VII. The taxoids and phenolic constituents of the roots of *Taxus wallichiana*. Indian journal of chemistry section B-organic chemistry including medical chemistry. 2000; 39(7):562–566.
18. Faraz Rad, Morad Jafari, Mahmoud Pouryousef Miyandoab, Nabi Khezzinejad. An Efficient Plant Regeneration System via Direct Organogenesis with in Vitro Flavonoid Accumulation and Analysis of Genetic Fidelity among Regenerants of *Teucrium polium* L. Horticulture, Environment and Biotechnology 55(6):568–577 · January 2015 with 186 Reads DOI: 10.1007/s13580-014-0611-7.
19. Бутенко П.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
20. Hiroaki Hayashi, Yasumasa Ikeshiro, Noboru Hiraoka, Hirobumi Yamamoto. Organ specific localization of flavonoids in *Glycyrrhizaglabra* L. Plant Science. May 1996; 116(2):233–238 DOI: 10.1016/0168-9452(96)04387-7.
21. Доан Тху Тхуи, Калашикова Е.А., Зайцева С.М., Киракосян Р.Н. О способности микроклонов лекарственных растений на примере *Dioscorea caucasica* Lipsky к образова-

- нию биофлаваноидов. Естественные и технические науки. 2018; 2:38.
22. Калашикова Е.А., Зайцева С.М., ДоанТхуТхуи, Киракосян Р.Н. Изучение биологической активности экстрактов, полученных из микроклонов лекарственных растений различных таксономических групп в условиях *in vitro*. Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2018; 2:50–58.
  23. Запрометов М.Н., Стрекова В.Ю., Субботина Г.А., Загоскина Н.В. Действие кенетина на дифференциацию и образование фенольных соединений в каллусной культуре чайного растения. Физиология растений. 1986; 33(2):356–364.
  24. Доан Тху Тхуи, Зайцева С.М., Калашикова Е.А., Киракосян Р.Н. О влиянии регуляторов роста на способность микроклонов лекарственных растений *Dioscorea caucasia* Lurisky к образованию и локализации полифенолов. Актуальные вопросы ветеринарной биологии. 2018; 2(38):39–45.
  25. Bhaising S.R., Maheshwari V.L. Plant tissue culture – a potential source of medicinal compounds. J. Scientific and Industrial research. 1998; 57:703–708.
  26. 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; 52:755–762.
  27. Qunfeng Zhang, Meiya Liu, Jianyun Rua. Metabolomics analysis reveals the metabolic and functional roles of flavonoids in light-sensitive tea leaves. Plant Biology. 2017 March 8.
  28. Eichholz I., Huyskens-Keil S., Keller A., Ulrich D., Kroh L.W., Rohn S. UV-B-induced changes of volatile metabolites and phenolic compounds in blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). Food Chem. 2011; 126:60–64.
  29. Dixon R., Paiva N. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. Plant cell. 1995; 7:1085–1097.
  30. Grandmaison J., Olah G.M., Van Calsteren M.R., Furlan V. Characterization and localization of plant phenolics likely involved in the pathogen resistance expressed by endomycorrhizal roots. Mycorrhiza. 1993; 3:155–164.

Поступила после доработки 27 сентября 2019 г.

## SYNTHETIC GROWTH REGULATORS: ROLE IN MICROCLONAL REPRODUCTION OF MEDICINAL PLANTS *DIOSCOREA NIPPONICA* MAKINO, FORMATION AND LOCALIZATION OF POLYPHENOLS

© Authors, 2020

### E.A. Kalashnikova

Dr.Sc. (Biol.), Professor, Department of Genetics, Breeding and Biotechnology,  
Moscow State Agricultural University MTAА named after K.A. Timiryazev  
E-mail: Kalash0407@mail.ru

### S.M. Zaytseva

Ph.D. (Biol.), Associate Professor, Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K.I. Skryabin  
E-mail: Smzaytseva@yandex.ru

### Doan Thu Thuy

Ph.D. (Biol.), Associate Professor, Vietnam National University of Agriculture (Republic of Vietnam, Hanoi)  
E-mail: doanthuycgct@gmail.com

### R.N. Kirakosyan

Ph.D. (Biol.), Associate Professor, Department of Genetics, Breeding and Biotechnology,  
Moscow State Agricultural University MTAА named after K.A. Timiryazev  
E-mail: Mia4129@mail.ru

**Relevance of work.** Thanks to clonal micro-reproduction, it became possible to preserve endangered medicinal plants by genetic banks *in vitro*. Obtained in the shortest possible time regenerative plants, genetically identical to the original intact plant, can be considered as potential sources of secondary metabolites-valuable biologically active substances widely used in the pharmaceutical industry.

**The aim** of our study was to study the effect of the hormonal composition of the nutrient medium on the microclonal reproduction of plants *Dioscorea nipponica* Makino, as well as on the formation and localization of phenolic compounds in plant regenerants multiplied *in vitro*.

**Material and Methods.** The object of the study was intact plants *Dioscorea nipponica* Makino and microclones derived from them. For the induction of the formation of axillary shoots, adventitious buds and microtubers primary explants were cultured on a nutrient medium containing mineral salts according to the recipe of Murashige and Skoog and various substances with cytokinin and auxin activity at a temperature of 24 C and 16-hour photoperiod. For rooting micropolygon used a modified containing ½ norms macrosoma, 20 g/l sucrose, 7 g/l agar and IAA at a concentration of 1 mg/L. Adaptation of plants held in containers containing proantocyanidinas substrate. The content of soluble phenolic compounds (with Folin-Denis reagent), flavans (with vanillin reagent) and flavonols (with aluminum chloride) was determined by spectrophotometric method in alcohol plant extracts. Localization of polyphenols was determined by histochemical methods (0.08% fast Blue reagent raster, reaction with vanillin reagent in hydrochloric acid vapor).

**Results.** The resulting microclone medicinal plants with a high biosynthetic capacity to the formation of polyphenols (flavanol and flavanols), was characterized by intense growth, the formation of a powerful biomass and adventitious roots. Flavans were major components of the phenolic complex of regenerating plants.



**Summary.** The species-specific ability to synthesize phenolic compounds is preserved *in vitro*. And in the education of bioflavonoids observed organospecificity, which, in a less pronounced degree, is preserved *in vitro*. It was revealed that the intensity of staining of tissues of microclones was slightly lower, which is consistent with the data on the quantitative content of polyphenols in them. Synthetic growth regulators with cytokinin activity (especially the drug Dropp), have a bright stimulating effect not only on the process of clonal micropropagation, but also on the biosynthetic activity against substances of phenolic nature. Biochemical data are confirmed by histochemical studies.

**Key words:** phenolic compounds, flavanes, flavanols, localization, Microclones, *Dioscorea nipponica* Makino.

**For citation:** Kalashnikova E.A., Zaytseva S.M., Doan Thu Thuy, Kirakosyan R.N. Synthetic growth regulators: role in microclonal reproduction of medicinal plants *Dioscorea nipponica* Makino, formation and localization of polyphenols. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2020;23(1):42–50. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-01-07>

## REFERENCES

- Nosov A.M. Regulyaciya sinteza vtorychnyh soedinenij v kul'ture kletok rastenij // Biologiya kul'tiviruemyh kletok i biotekhnologiya rastenij / Pod red. R.G. Butenko. M.: Nauka, 1991.
- Takeda H, Kotake T. Expression and function of cell wall-bound cationic peroxidase in Asparagus somatic embryogenesis. Plant physiology preview. 2003; 131:1765–1774.
- Manorma Sharma, ArchanaSharma, Ashwani Kumar, Saikat Kumar Basu Enhancement of Secondary Metabolites in Cultured Plant Cells Through Strees Stimulus. American Journal of Plant Physiology. 2011; 6(2):50–71.
- Hodeba D. Mignouna Mathew M. Abang Robert Asiedu R. Geeta. Culturing Meristematic Tissue and Node Cuttings from Yams (*Dioscorea*). Cold Spring Harbor Protocols 2009 (11):pdb.prot5325, November 2009 with 28 Reads DOI: 10.1101/pdb.prot5325.
- Alekseeva G.M., Belodubrovskaya G.A., Blinova K.F., Goncharov M.Yu. Farmakognoziya. Lekarstvennoe syr'e rastitel'nogo i zhivotnogo proiskhozhdeniya / Pod red. G.P. YAKovleva. SPb: SpecLit, 2013.
- Tyukavkina N.A. Bioflavonoidy. M.: Izdatel'skij dom «Russkij vrach», 2002. 56 s.
- Zaprometov M. N. Fenol'nye soedineniya i metody ih issledovaniya. Biohimicheskie metody v fiziologii rastenij. M.: Nauka, 1971. S. 185–197.
- Soukupova J., Cvikrova M., Albrechtova J. Histochemical and Biochemical Approaches to the Study of Phenolic Compounds and Peroxidases in Needles of Norway Spruce (*Piceaabies*). New Phytol. 2000; 146:403–414.
- Y-M Zhao, Y-Y Hong, Y-F Zhou, B-C Wu. Pollination biological character of *Dioscorea nipponica* subsp. *Rosthormii*. Journal of Plant Resources and Environment. 2008; 17(2):15–21.
- Zaprometov M.N. Fenol'nye soedineniya i ih rol' v zhizni rasteniya. LVI Timiryazevskie chteniya. M.: Nauka, 1996. 45 s.
- Jaakola L., Hohtola A. Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants. Plant, cell and Environment. 2010; 33(8):1238–1247.
- Santiago L., Louro R. Compartmentation of phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase in Itaves of *Phyllanthus tenellus* and their induction by copper sulphate. Annals of botany. 2000; 86:1023–1032.
- Laurent Laplaze, Hassen Gherbi, Thierry Frutz, Katharina Pawlowski, Claudine Franche, Jean-Jacques Macheix, Florence Auguy, Didier Bogusz, and Emile Duhoux. Flavan-Containing Cells Delimit Frankia-Infected Compartments in *Casuarina glauca* Nodules. Plant Physiology. 1999; 121:113–122.
- Zaprometov M.N. Nikolaeva T.N. Sposobnost' izolirovannyh hloroplastov iz list'ev fasoli osushchestvlyat' biosintez fenol'nyh soedinenij. Fiziologiya rastenij. 2003; 50(5):699–702.
- Giovanni Fgati, Elisa Azzarello, Susanna Polastri, Massimiliano Tattini. Flavanoids as antioxidants: Localisation and functional significance. Plant Science. 2012; 196:67–76.
- Doan Thu Thui, Kalashnikova E.A., Zajceva S.M., Kirakosyan R.N. Fenol'nye soedineniya rastenij Dioskorei kavkazskoj (*Dioscorea caucasica* Lipsky), osobennosti ih obrazovaniya i lokalizacii. Estestvennye i tekhnicheskie nauki. 2018; 2:24–27.
- Chattopadhyay S.K. Studies on the Himalayan yew *Taxus wallichiana*- part VII- The taxoids and phenolic constituents of the roots of *Taxus wallichiana*. Indianjournal of chemistry section B-organic chemistry including medical chemistry. 2000; 39(7):562–566.
- Faraz Rad, Morad Jafari, Mahmoud Pouryousef Miyandoab, Nabi Khezrinejad. An Efficient Plant Regeneration System via Direct Organogenesis with in Vitro Flavonoid Accumulation and Analysis of Genetic Fidelity among Regenerants of *Teucriumpolium* L. Horticulture, Environment and Biotechnology 55(6):568–577 · January 2015 with 186 ReadsDOI: 10.1007/s13580-014-0611-7.
- Butenko R.G. Biologiya kletok vysshih rastenij in vitro ibiotekhnologiya na ih osnove. M.: FBK-PRESS, 1999. 160 s.
- Hiroaki Hayashi, Yasumasa Ikeshiro, Noboru Hiraoka, Hirobumi Yamamoto. Organ specific localization of flavonoids in *Glycyrrhizaglabra* L. Plant Science. May 1996; 116(2):233–238 DOI: 10.1016/0168-9452(96)04387-7.
- Doan Thu Thui, Kalashnikova E.A., Zajceva S.M., Kirakosyan R.N. O sposobnosti mikroklonov lekarstvennyh rastenij na primere *Dioscorea caucasica* Lipskyk obrazovaniyu bioflavonoidov. Estestvennye i tekhnicheskie nauki. 2018; 2:38.
- Kalashnikova E.A., Zajceva S.M., DoanThuThui, Kirakosyan R.N. Izuchenie biologicheskoy aktivnosti ekstraktov poluchennyh iz mikroklonov lekarstvennyh rastenij razlichnyh taksonomicheskikh grupp v usloviyah in vitro. Veterinariya, zootekhnika i biotekhnologiya. 2018; 2:50–58.
- Zaprometov M.N., Strekova V.Yu., Subbotina G.A., Zagoskina N.V. Deystvie kenetina na differenciaciyu i obrazovanie fenol'nyh soedinenij v kallusnoj kul'ture chajnogo rasteniya. Fiziologiya rastenij. 1986; 33(2):356–364.
- Doan Thu Thui, Zajceva S.M., Kalashnikova E.A., Kirakosyan R.N. O vliyanii regulatorov rosta na sposobnost' mikroklonov lekarstvennyh rastenij *Dioscorea caucasica* Lipskyk obrazovaniyu i lokalizacii polifenolov. Aktual'nye voprosy veterinarnoj biologii. 2018; 2(38):39–45.
- Bhaising S.R., Maheshwari V.L. Plant tissue culture – a potential source of medicinal compounds. J. Scientific and Industrial research. 1998; 57:703–708.
- Dubravina G.A., Zajceva S.M., Zagoskina N.V. Izmeneniya v obrazovanii i lokalizacii fenol'nyh soedinenij pri dedifferenciacii tkanej tissa yagodnogo i tissa kanadskogo v usloviyah in vitro. Fiziologiya rastenij. 2005; 52:755–762.
- Qunfeng Zhang, Meiya Liu, Jianyun Rua. Metabolomics analysis reveals the metabolic and functional roles of flavonoids in light-sensitive tea leaves. Plant Biology. 2017 March 8.
- Eichholz I., Huyskens-Keil S., Keller A., Ulrich D., Kroh L.W., Rohn S. UV-B-induced changes of volatile metabolites and phenolic compounds in blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). Food Chem. 2011; 126:60–64.
- Dixon R., Paiva N. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. Plant cell. 1995; 7:1085–1097.
- Grandmaison J., Olah G.M., Van Calsteren M.R., Furlan V. Characterization and localization of plant phenolics likely involved in the pathogen resistance expressed by endomycorrhizal roots. Mycorrhiza. 1993; 3:155–164.