

УДК 581.1

СПЕЦИФИКА РОСТА И НАКОПЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ У РАСТЕНИЙ И КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР *Lychnis chalconica*, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ ЭКСПЛАНТОВ РАЗНЫХ ОРГАНОВ

© 2024 г. И. Ф. Головацкая^{а,*}, Ю. В. Медведева^а, М. К. Кадырбаев^а, Е. В. Бойко^а^аФедеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Национальный исследовательский Томский государственный университет”, Томск, Россия

*e-mail: golovatskaya.irina@mail.ru

Поступила в редакцию 16.09.2023 г.

После доработки 17.11.2023 г.

Принята к публикации 09.12.2023 г.

Флавоноиды имеют многочисленные функции в растении, одной из которых является регуляция роста. В ходе исследования получены каллусные культуры от разных структурных элементов — корня, гипокотыля, основания побега и семядоли 5- и 14-дневных растений лихниса хальцедонского (*Lychnis chalconica* L.), изучены темпы роста соответствующих каллусных тканей и накопление ими флавоноидов (Фл). Спектрофотометрически определено суммарное содержание Фл в листьях разных ярусов вегетирующих растений. Методом ВЭЖХ проанализировано содержание трех Фл: рутина (Р), кверцетина (КВ) и дигидрокверцетина (ДГКВ) в корнях, листьях и соцветиях цветущих растений, культивированных на дерново-подзолистой почве Томской области (Россия). Изучены рост и суммарное содержание фенольных соединений и трех Фл у каллусной и суспензионной культур, полученных от эксплантов корня молодых растений лихниса. Установлены особенности роста и органоспецифичность в накоплении индивидуальных Фл. Показана зависимость физиологического состояния листьев и клеточных культур от содержания Фл. Суспензионная культура (10 пассаж), полученная из каллуса корня (92 пассаж), на 14 сутки имела близкое содержание Р и ДГКВ с исходной линией каллусной культуры и более низкий уровень КВ. В корнях цветущих растений присутствовал преимущественно ДГКВ, тогда как в соцветиях и верхних листьях — Р. Установлена тенденция уменьшения Р в ряду органов: соцветие ≥ листья > корень. В распределении КВ показана обратная Р зависимость. Содержание ДГКВ в листьях было в 1.9 раза меньше ($P < 0.05$), чем в соцветии. Уровень этого Фл в корнях был многократно выше ($P < 0.05$), чем в надземных органах. Вслед за увеличением окислительного статуса зрелого листа вегетирующих растений лихниса относительно молодого листа активировались осмотическая и антиоксидантная системы, включающие пролин и суммарный уровень Фл. В тоже время каллус (6 пассаж), полученный на основе более молодых тканей гипокотыля 5-дневных проростков, имел следовые количества изученных Фл, тогда как каллус, сформированный из более зрелых тканей основания побега 14-дневных проростков, характеризовался более высоким уровнем разных Фл. На основе полученных данных можно предположить участие Фл в регуляции роста листьев и клеточных культур за счет их антиоксидантных или регуляторных свойств.

Ключевые слова: *Lychnis chalconica*, каллусная культура, метод ВЭЖХ, почвенная культура, суспензионная культура клеток, флавоноиды

DOI: 10.31857/S0015330324030074, EDN: NMKOEI

ВВЕДЕНИЕ

Ухудшение условий существования растений в силу изменения климата и загрязнения почвы вследствие интенсивной сельскохозяйственной, нефте- и рудодобывающей деятельности человека, усиленная эксплуатация дикорастущих и плантационных растений — традиционного

источника лекарственных средств — приводят к растущему дефициту сырья. Использование культур клеток и тканей растений в качестве источника биологически активных веществ (БАВ) помогает спасти от уничтожения редкие дикорастущие растения, синтезирующие необходимые для жизнедеятельности человека вещества. Кроме того, этот биотехнологический метод позволяет решить проблему круглогодичного получения БАВ в отсутствии загрязнения патогенами и их продуктами жизнедеятельности

Сокращения: ВМ — вторичные метаболиты; ДГКВ — дигидрокверцетин; КВ — кверцетин; Про — пролин; Р — рутин; Фл — флавоноиды; ФС — фенольные соединения; ЦК — цитокинины.

и др. [1]. В случае, если условия культивирования установлены и стандартизированы, то производство желаемых БАВ постоянно, в то время как в интактных растениях их концентрация зависит от многих факторов.

Растения характеризуются способностью синтезировать вторичные метаболиты (ВМ), среди которых выделяют многочисленную группу флавоноидов (Фл). Фл представляют собой класс гидроксилированных фенольных соединений (ФС), имеющий сложную гетероциклическую структуру. Фл построены на основе структуры С6 (кольцо А)-С3 (кольцо С)-С6 (кольцо В). В зависимости от степени окисления трехуглеродного участка, Фл разделяют на антоцианы (дигидрофлавонолы), флавононы, флавоны, флавонолы и изофлавонолы [2–4].

Биогенетическим предшественником Фл служит фенилаланин, который образуется в шикиматном пути в хлоропластах и из которого в цитозоле синтезируются Фл. Комплекс Фл с глутатионом транспортируется АВС-переносчиком в вакуоли клетки, где происходит их накопление и хранение [1, 5, 6]. Фл могут накапливаться в свободном пространстве и хлоропластах [1].

На накопление БАВ в растениях влияют их стадии развития и возраст [7]. Многие лекарственные растения накапливают большое количество ВМ в основном в период репродуктивного роста. На стадии плодоношения корень и корневище 2-летней *Echinacea purpurea* (L.) Moench имеют более высокий уровень цикориевой кислоты, а *Astragalus compactus* Lam. (Fabaceae) – фенолов, тогда как олеаноловая кислота и экидистерон в корне *Achyranthes bidentata* выше в период вегетативного роста. Содержание общих Фл в корне *Scutellaria baicalensis* Georgi стабильно на протяжении всей стадии роста, но содержание байкалина увеличивается, а затем постепенно снижается. Содержание сапонинов в *Panax ginseng* С.А. Меу. увеличивается с возрастом растения. В процессе жизнедеятельности растений меняется состав ВМ. Например, содержание рутина (Р) и кверцетина (КВ) максимально у 7-летних растений, магнолола – у 10-летних растений, тогда как хлорогеновой кислоты, гиперина и КВ – в коре 13-летних растений *Magnolia officinalis* Rehder & E.H. Wilson.

Фл выполняют защитную функцию от патогенов, УФ-излучения и света высокой интенсивности, осуществляют биологическую коммуникацию в ризосфере, регуляцию транспорта ИУК и его метаболизма, повышают эффективность извлечения питательных веществ во время старения растения, реализуют антиоксидантную функцию [8]. Обобщая сведения для интактного растения, профессор А.М. Носов [9] среди основных функций вторичных метаболитов называет экологическую функцию. В то же вре-

мя, опираясь на принцип мультифункциональности вторичного метаболизма, он считает, что второстепенные функции метаболитов в случае культивирования клеток *in vitro* могут быть полезными для интенсивной или устойчивой пролиферации клеток.

Известно, что лихнис хальцедонский характеризуется присутствием фитоэкидистероидов, содержание которых зависит от органа, стадии развития и условий существования. В то же время представляет интерес присутствие других ВМ, которые позволяют повысить значимость вида для фармакологии. В растениях лихниса обнаружены следующие Фл: виценин, витексин и неовитексин [10]. В совокупности комплекс Фл оказывает противовоспалительную и анальгетическую активность [11].

Для оценки важности отдельных лекарственных растений для фармакологии необходимо изучить органно-тканевую специфичность тех или иных лекарственных компонентов, а также взаимосвязь между морфогенезом, синтезом и накоплением этих компонентов в лекарственных растениях. Выявление закономерностей накопления Фл необходимо и для решения проблемы расширения разнообразия продукции растениеводства.

В связи с этим целью исследования явилось изучение роста и содержания индивидуальных веществ флавоноидной природы в каллусных и суспензионных культурах, полученных на основе эксплантов разных органов молодых растений *Lychnis chalcidonica* L. Кроме того, нами изучено суммарное содержание ФС и их отдельных представителей в интактных растениях на вегетативной и репродуктивной стадиях онтогенеза. Выполнено сравнительное исследование суммарного накопления Фл и близких по структуре Фл: Р, КВ и дигидрокверцетина (ДГКВ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Работу выполняли на растениях лихниса хальцедонского (*Lychnis chalcidonica* L.) и его каллусных и суспензионной культурах. Одна группа растений лихниса выращена в природных условиях на дерново-подзолистой почве Томской области и получены семена. Другая группа растений выращена в условиях лаборатории в осветительной установке при плотности потока фотонов 130–170 мкмоль/(м² с), при 16-часовом фотопериоде и температуре воздуха 20–22°C на почвогрунте “Гарант” Универсал цветочный (ПК “Темп-2”, Кисловка, Томская область). Грунт содержал (мг/кг): N – 40, P₂O₅ – 70, K₂O – 150 и микроэлементы (Mg, Fe, Cu, Mo, B, Mn). Состав почвогрунта: 25% – биогумус, 35% – торфоперегной, 35% – торфонизинный, переходный, 5% – песок речной, pH 6.5–7.0.

У вегетирующих 1,5-месячных растений, выросших на почвогрунте, анализировали биохимические параметры листьев разных ярусов, при этом ввели понятия: молодые, зрелые и стареющие листья. В качестве параметров для выделения групп листьев использовали площадь пластинки и интенсивность ее окраски. Молодыми листьями считали активно растущие листья, зрелыми — завершившие растяжение листовой пластинки, стареющими — теряющие интенсивность зеленой окраски (данные не приведены). Для характеристики физиологического состояния листьев дополнительно анализировали интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и уровень свободного пролина (Про). Для анализа листья брали в утренние часы (через 2 ч после начала освещения).

У цветущих 3-месячных растений природной популяции оценивали уровень Фл в различных органах (корень, листья цветочного побега, соцветия).

У каллусных (6 и 92 пассаж) и суспензионных (10 пассаж) культур определяли ростовые показатели и содержание индивидуальных Фл и суммы ФС.

Получение стерильных проростков. Сухие семена *Lychnis chalcedonica* стерилизовали раствором, содержащим 96% $C_2H_5OH:H_2O:33\% H_2O_2$ в соотношении 13:1:1 по объему [12]. Для этого семена помещали на 15 мин в чашки Петри на стерильные бумажные фильтры, смоченные стерилизующим раствором, в ламинарном боксе БМБ-II-“Ламинар-С”-1.8 (Neoteric, Россия), затем высушивали в потоке воздуха ламинара и перед посевом обрабатывали под УФ в течение 2 мин. Семена (по 15–20 шт.) переносили

в сосуды для культивирования на 50% безгормональную питательную среду Мурасиге-Скуга (МС-среда) [13], содержащую 4.5 г/л агар, 15 г/л сахарозы и 0.5 мг/л каждого витамина (тиамин, никотиновая кислота, пиридоксин), рН 5.7–5.8. Из стерильных семян в асептических условиях выращивали 5- и 14-дневные растения. У 5-дневных растений *Lychnis chalcedonica* семядольные листья достигали 6–8 мм и появился первый настоящий лист (рис. 1а), тогда как у 14-дневных растений начала формироваться розетка из двух настоящих листьев размером 10–15 мм (рис. 1б), корни имели длину около 10 мм. Растения были рассечены на разные структурные элементы (корень, гипокотиль, основание побега — стебель с почками, семядоли), которые были использованы в качестве эксплантов.

Получение каллусных культур. Экспланты переносили на 50% МС-среду, содержащую гормоны НУК (2 мг/л) и БАП (0.5 мг/л) и культивировали в темноте при температуре $23 \pm 1^\circ C$. Полученный от эксплантов каллус переносили вместе с эксплантом на свежую МС-среду того же состава, а при хорошем приросте каллуса его отделяли от экспланта и культивировали отдельно [1]. Для получения каллуса от эксплантов гипокотилля использовали стерильные 5-дневные растения *Lychnis chalcedonica* (рис. 1а). Размер гипокотилля в этот период не превышал 2–3 мм, что замедляло образование каллуса, однако позднее выделение гипокотилля из растений было затруднено, так как уже с 4–5 суток начинался следующий этап развития — формирование побега с узлами и настоящими листьями. Оптимальным возрастом растений для выделения эксплантов из семядольных листьев были 5 сутки. В этом возрасте

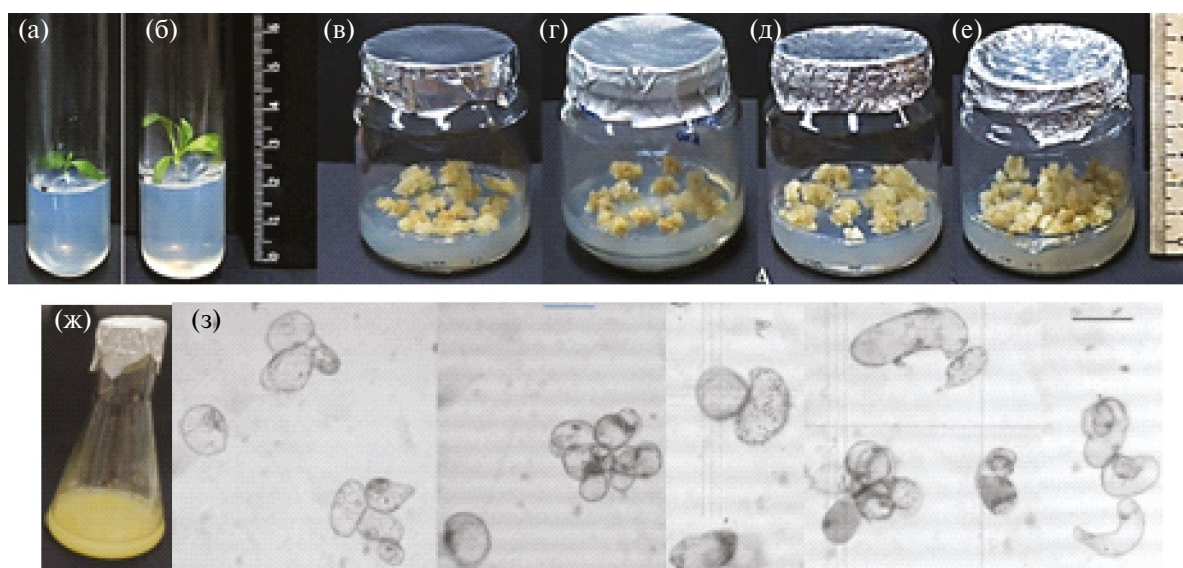


Рис. 1. Стерильные 5- (а) и 14-дневные (б) растения *Lychnis chalcedonica*; каллусная культура линий 5Г (b), 14ОП (r), 5К (д) и 14К (е) через 25 суток культивирования (6 пассаж); суспензионная культура (ж) и ее клетки (з). Экспланты: Г — гипокотиль, ОП — основание побега, К — корень. Размер бара — 100 мкм.

семядольные листья достигали длины 8–10 мм (рис. 1а). На эксплантах, взятых с 14-дневных растений, наблюдали менее интенсивное каллусообразование (рис. 1б). Первичный каллус формировался плотным и имел светло-зеленую или желто-зеленую окраску.

Из полученных каллусов было отобрано несколько линий для дальнейшего культивирования: 5Г, 14СЛ, 14К, 14ОП (рис. 1в, 1г, 1д, 1е). Отбор проводили по следующим критериям: сохранение разнообразия исходных эксплантов; отсутствие посторонних морфогенных структур на первичном каллусе; стабильный рост; хорошая выживаемость, отсутствие значительных некрозов.

Получение суспензионной культуры корня. Суспензионную культуру лихниса получали из длительно культивируемой каллусной культуры корня (92 пассаж), которую помещали в плоскодонные конические колбы Эрленмейера с жидкой МС-средой. Колбы размещали на орбитальном шейкере Multi PSU-20 BIOSAN (SIA Biosan, Латвия), режим перемешивания (100–110 об/мин), температура 25–26°C. Исходная навеска каллусной культуры (4 г) была помещена в 50 мл МС-среды. Через 21 сутки было проведено первое пассирование с последующим 10–15-кратным субкультивированием через каждые 14 суток. За это время суспензионная культура перешла к экспоненциальной стадии роста и представляла собой мелкие клеточные агрегаты и отдельные клетки (рис. 1ж, 1з).

Ростовые параметры культур. Используя гравиметрический метод, определяли свежую (FW) и абсолютно сухую (DW) биомассу каллусов с помощью аналитических весов РА-114 (Ohaus, КНР). Сухую биомассу в последующем использовали для оценки содержания в ней антиоксидантов фенольной природы, в том числе Фл.

Оценку относительного прироста культуры на 28 суток производили по формуле:

$$PI_{28} = (M_{28} - M_0) / M_0, \quad (1)$$

где M_{28} – конечная сырая или сухая масса каллусов (на 28 суток субкультивирования, M_{28}), M_0 – начальная биомасса каллуса [14].

Растворимые фенольные соединения (ФС) определяли по методу Фолина-Дениса [15]. Оптическую плотность раствора измеряли при 725 нм против контроля, содержащего этанол вместо тканевого экстракта. Суммарное содержание ФС рассчитывали в пересчете на рутин и DW.

Спектрофотометрическое определение общего содержания флавоноидов. Определение суммарного содержания флавоноидов (Фл) основано на их комплексообразовании с хлоридом алюминия и последующем измерении оптической плотности

окрашенных растворов при 415 нм на спектрофотометре Genesys 10S UV-Vis (ThermoScientific, США) [16]. Суммарное содержание Фл рассчитывали в пересчете на рутин и DW.

ВЭЖХ-анализ флавоноидов. Количественное определение Фл проводили методом ВЭЖХ с использованием жидкостного хроматографа Agilent 1260 Infinity с детектором на диодной матрице DAD (Agilent Technologies Inc., США). Использовали оригинальную колонку Zorbax Eclipse Plus C18 (4.6 мм × 100 мм × 3.5 мкм). Обнаружение пиков проводили в диапазоне от 190 до 390 нм. Длина волны обнаружения рутина составила 254 нм, кверцетина – 290 нм, дигидрокверцетина – 360 нм. Разделение проводили с использованием смеси ацетонитрила и 0.04 М калия фосфорнокислого монозамещенного с ортофосфорной кислотой в качестве подвижной фазы (рН 2.8). Скорость потока элюента составила 0.25 см³/мин. Идентификацию индивидуальных Фл в каждом экстракте определяли путем сравнения времени удерживания и УФ-спектров образцов с данными стандартов: рутин гидрата (содержание основного вещества более 95%) (Merck, Германия), КВ (содержание основного вещества не менее 98%) (Россия), ДГКВ (содержание не менее 90%, ГОСТ 33504) (Россия) (рис. 2а, б, в).

Для количественного определения Фл в растительном сырье навеску образца для анализа (около 1 г) абсолютно сухого растительного сырья экстрагировали 70% раствором этилового спирта (10 – 20 мл, в зависимости от образца). Колбу присоединяли к рефлюкс-конденсатору и нагревали на кипящей водяной бане в течение 60 мин. После охлаждения фильтровали через целлюлозный фильтр [17].

Содержание Фл в растительном сырье определяли путем сравнения площади пиков, полученных при разделении индивидуальных Фл в пробе и соответствующих веществ в рабочих стандартных образцах.

Массовую концентрацию Фл рассчитывали по формуле:

$$X = (S_x \times C \times V \times 10) / (S_{\text{pco}} \times 25 \times m), \quad (2)$$

где S_x – площадь пика определяемого Фл в подготовленной пробе; S_{pco} – площадь пика рабочего стандартного раствора Фл; C – концентрация Фл в рабочих стандартных образцах, мг/см³ (0.1 мг/см³); m – навеска пробы, г; V – объем этилового спирта, добавленного для экстракции Фл, см³ [18].

Пример разделения Фл в растительном сырье приведен на рис. 3а, 3б.

Выбор данных представителей Фл был основан на их функциях в человеческом организме (для КВ – противовоспалительная, антиоксидантная, антидепрессивная, противоопухоле-

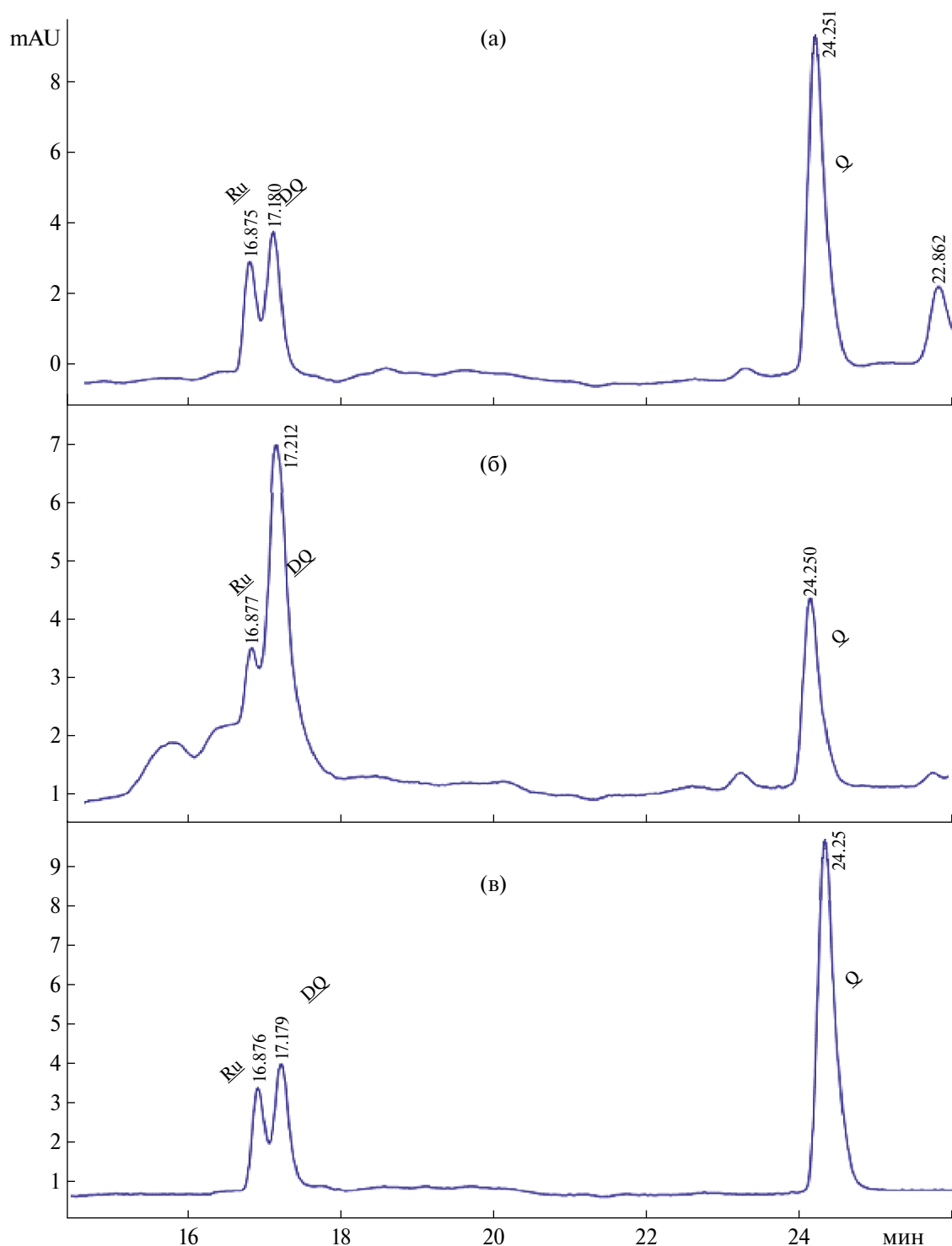


Рис. 2. Хроматографическое разделение флавоноидов стандартных растворов: а – рутин (Ru) $C = 0.1 \text{ мг/см}^3$, $\lambda = 254 \text{ нм}$ (время выхода – $16.691 \pm 0.080 \text{ мин}$); б – дигидрокверцетин (DQ) $C = 0.1 \text{ мг/см}^3$, $\lambda = 290 \text{ нм}$ (время выхода – $17.252 \pm 0.090 \text{ мин}$); в – кверцетин (Q) $C = 0.1 \text{ мг/см}^3$, $\lambda = 360 \text{ нм}$ (время выхода – $24.220 \pm 0.050 \text{ мин}$).

вая) [19] и метаболической связи [20, 21]. ДГКВ преобразуется в КВ с помощью фермента FLS (флаванолсинтазы) под контролем MYB11/12/111 (рис. 4). Гликозилирование КВ с образованием Р происходит в 2 этапа: F3GT (флавонол-3-О-глюкозилтрансфераза) превращает КВ в изокверцитрин (кверцетин-3-О-глюкозид), а затем F3G6"RhaT (флавонол-3-О-глюкозид-6"-О-рам-

нозилтрансфераза) превращает изокверцитрин в Р (кверцетин-3-О-рутинозид).

Спектрофотометрическое определение интенсивности перекисного окисления липидов. Интенсивность ПОЛ определяли по содержанию МДА, по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [22]. Для этого образец листьев измельчали в 20% растворе ТХУ. Экстракт цен-

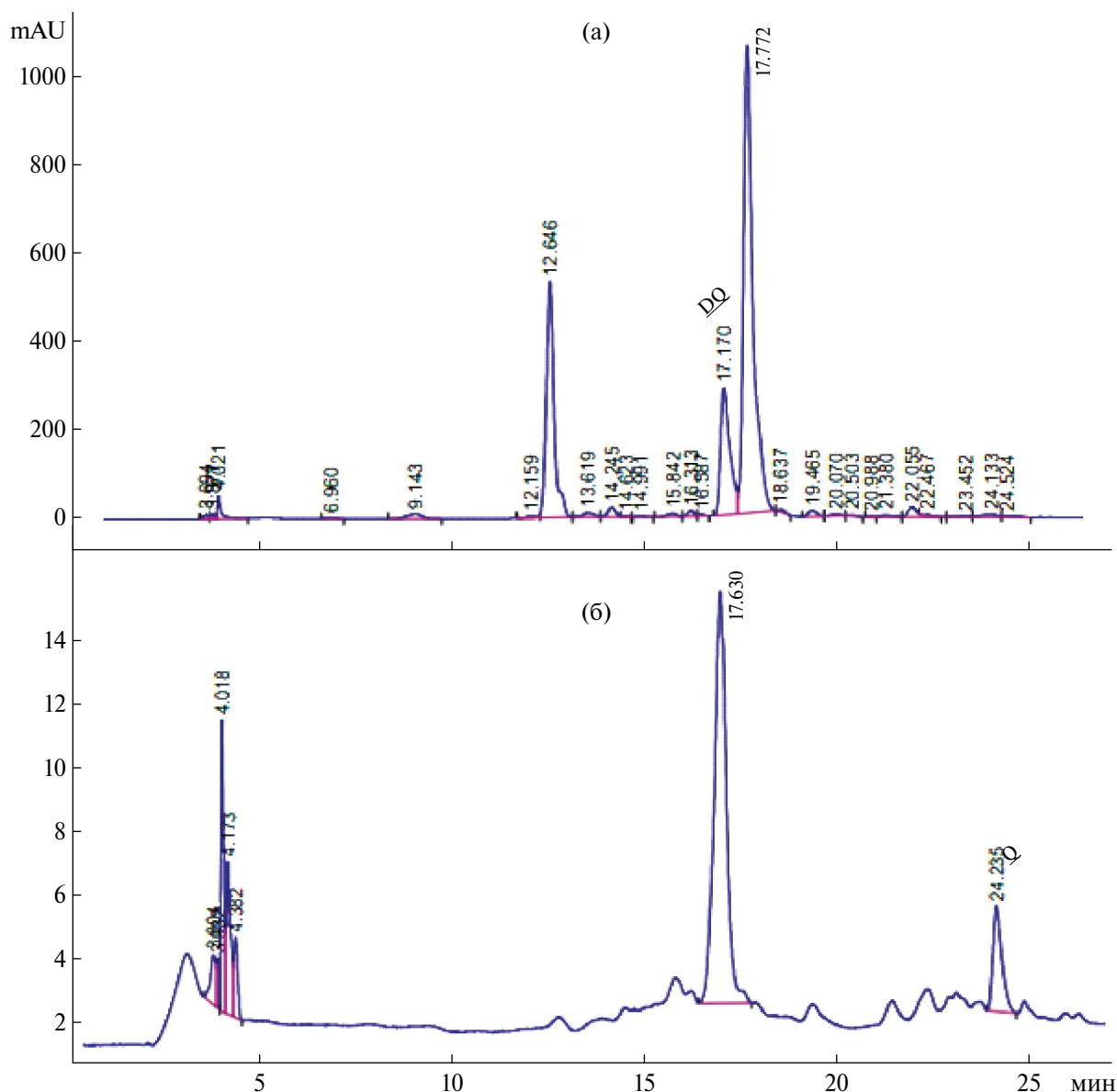


Рис. 3. Пример определения дигидрокверцетина (DQ) и кверцетина (Q) в растительном сырье: а – DQ, время выхода – 17.170 мин; б – Q, время выхода – 24.235 мин.

трифугировали на центрифуге Eppendorf 5430R (Eppendorf, Германия) в течение 15 мин при 12000 g и температуре 4°C. Цветную реакцию алиquotы супернатанта с ТБК проводили при 98°C в течение 30 мин. Оптическую плотность раствора с образовавшимся розовым хромогеном измеряли при двух длинах волн – 532 и 600 нм на спектрофотометре Genesys 10S UV-Vis (ThermoScientific, США).

Спектрофотометрическое определение свободного пролина (Про). Уровень Про определяли по реакции с нингидрином в кислой среде [23] и измерению оптической плотности раствора при 520 нм.

Статистический анализ. Для сравнения параметров использовали параметрический t -критерий Стьюдента и непараметрический U-кри-

терий Манна-Уитни для попарного сравнения групповых параметров. На рисунках представлены средние арифметические (M) значения для роста и биохимических ($n = 5$) параметров с двухсторонними доверительными интервалами ($M \pm 1.96 \times SEM$). Различия между значениями, отмеченными разными надстрочными латинскими буквами, были статистически значимыми при $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе исследования изучены темпы роста 4-х линий 28-дневной каллусной культуры *L. chalconica*, эксплантами для которой служили гипокотили (5-дневные растения), корень, основание побега – нижняя часть стебля

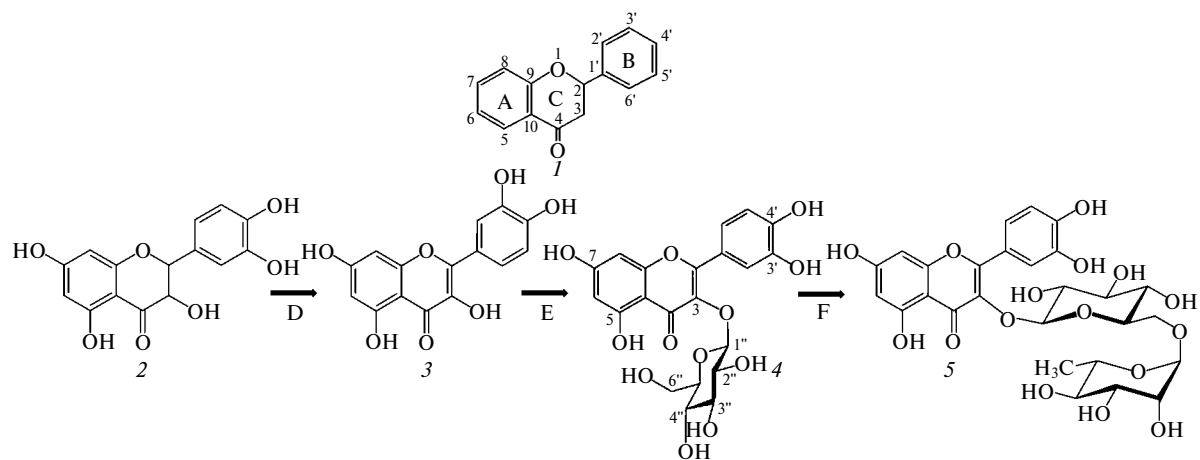


Рис. 4. Структурные формулы исследуемых флавоноидов и ферменты их биосинтеза. 1 – общая формула; 2 – ди-гидрокверцетин; 3 – кверцетин; 4 – изокверцитрин; 5 – рутин; D – FLS (флаванолсинтаза); E – F3GT (флаво-нол-3-О-глюкозилтрансфераза); F – F3G6''RhaT (флавонол-3-О-глюкозид 6''-О-рамнозилтрансфераза).

с почками и семядоли (14-дневные растения). Проведен биохимический анализ образцов растений природной популяции (у листьев разного физиологического состояния и разных органов растений) и каллусных культур на общее содержание Фл и содержание Р, КВ и ДГКВ (таксифолина). Последний представляет собой КВ, гидрированный в положениях 2 и 3 (рис. 4). Определен общий пул фенольных соединений у длительных каллусной и суспензионной культур, полученных от эксплантов корня лихниса.

Эффективность каллусообразования на различных эксплантах определяли при их культивировании на МС-среде с гормонами НУК (2 мг/л) и БАП (0.5 мг/л) в темноте и температуре 24 ± 1°С. Начало индукции каллуса наблюдали через 12–14 суток от начала культивирования на всех типах эксплантов. Первичный каллус лихниса имел белый, светло-желтый или светло-зеленый цвет, плотную (от эксплантов семядольных и настоящих листьев) или рыхлую, оводненную (от эксплантов гипокотилей и корней) консистенцию.

Каллусные культуры лихниса к пятому пассажу утрачивали явно выраженные внешние различия, были светло-желтого цвета, преиму-

щественно рыхлые, рассыпчатые, легко распадались на отдельные фрагменты массой 15–30 мг (рис. 1в–е). При этом линии 5К и 14К были светлее и плотнее (рис. 1д, е). В ходе субкультивирования оптимальную продолжительность пассажа для сохранения жизнеспособности культуры сокращали с 35 до 28 суток.

Спектрофотометрически и методом ВЭЖХ проанализировали суммарное содержание Фл (табл. 1) и трех индивидуальных Фл в растениях *L. chalcadonica* на стадии вегетации и репродукции, а также в культурах *in vitro*, полученных от эксплантов отдельных органов молодых растений (рис. 5).

Биохимический анализ растений *L. chalcadonica*, выросших в почвенной культуре в лабораторных условиях, показал, что содержание метаболитов, в том числе и суммарное содержание Фл, изменялось в зависимости от физиологического состояния листьев – их индивидуального возраста (разного яруса) (табл. 1).

На вегетативной стадии развития растений в почвенной культуре отмечали изменение интенсивности ПОЛ, оцениваемой по содержанию МДА, в листьях разных ярусов, а, следовательно, разного времени закладки и индивидуального возраста листа. Это, возможно, было связано с

Таблица 1. Содержание метаболитов в листьях разных ярусов растений лихниса в фазу вегетации

Ярусы	Физиологическое состояние листьев	МДА, мкмоль/г FW	Пролин, мкмоль/г FW	Флавоноиды, %
7–9	молодые	0.01 ± 0.001 ^c	0.709 ± 0.01 ^c	0.186 ± 0.01 ^b
4–6	зрелые	0.02 ± 0.002 ^b	0.827 ± 0.02 ^b	0.234 ± 0.02 ^a
1–3	стареющие	0.04 ± 0.002 ^a	1.582 ± 0.03 ^a	0.094 ± 0.01 ^c

Примечание. Одинаковыми надстрочными латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$.

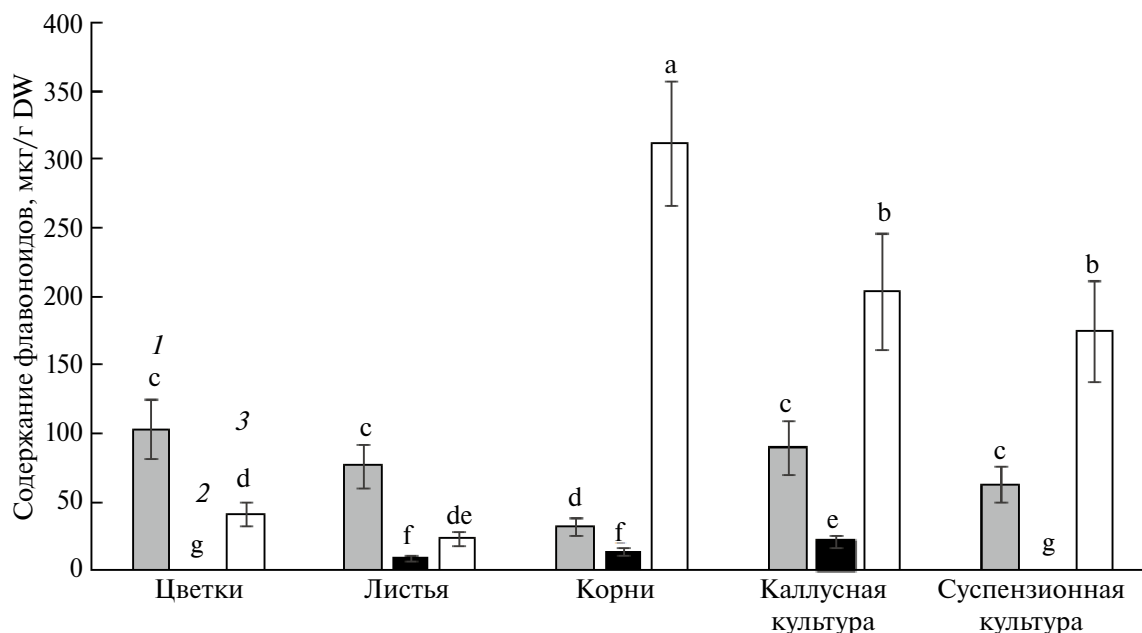


Рис. 5. Содержание индивидуальных флавоноидов в органах цветущих растений *Lychnis chalcidonica*, культивируемых в природной популяции, и в длительной каллусной и суспензионной культурах корней. 1 – рутин; 2 – кверцетин; 3 – дигидрокверцетин. Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$.

физиологическим состоянием листьев в процессе их формирования. По данным анализа интенсивность ПОЛ повышалась от листьев верхних ярусов (7–9, молодые) к листьям нижних ярусов (1–3, стареющие), т.е. молодые активно растущие листья имели меньшую интенсивность ПОЛ. Вслед за увеличением окислительного статуса листа активировались антиоксидантные системы клеток листа, включающие увеличение уровня Про и суммарного уровня Фл (табл. 1). Однако при формировании систем защиты отмечено взаимовлияние их представителей: двукратное увеличение Про в стареющих листьях приводило к аналогичному снижению суммарного содержания Фл.

При исследовании цветущих растений природной популяции обнаружили органоспецифичность в накоплении индивидуальных Фл (рис. 5). В корнях присутствовал преимущественно ДГКВ, тогда как в соцветиях и верхних листьях – Р. Анализ индивидуальных Фл показал тенденцию уменьшения Р в ряду органов: соцветие $\geq$ листья $>$ корень. В распределении КВ показана обратная Р зависимость корень $\geq$ листья $>$ соцветие, однако с существенно меньшим абсолютным уровнем этого Фл. Содержание ДГКВ в листьях было в 1.9 раза меньше ($P < 0.05$), чем в соцветии. В то же время уровень этого Фл в корнях был многократно выше ($P < 0.05$), чем в надземных органах.

Длительно культивируемая каллусная культура (92 пассаж), полученная от эксплантов корня, аккумулировала к 30 суткам в 2.7 и 1.5 раза

больше Р и КВ соответственно и на 35% меньше ДГКВ, чем корень растений природной популяции (рис. 3). В то же время полученная из каллуса суспензия (10 пассаж) на 14 сутки имела близкое содержание Р и ДГКВ с исходной линией каллусной культуры. При этом, однако, существенно снижался уровень КВ.

Многokrатно больший уровень ДГКВ ($P < 0.05$) в каллусной культуре, полученной от эксплантов корня растений лихниса, согласуется с его высоким уровнем в корне интактного цветущего растения. Однако специфика существования клеток в составе каллусной ткани определяла особенности метаболизма Фл. Каллусная культура корня в сравнении с интактным органом 2.7-кратно увеличивала содержание Р и 1.5-кратно – КВ ($P < 0.05$). У активно растущей суспензионной культуры на стационарной фазе к 14 суткам снижалось содержание Р и КВ ($P < 0.05$) относительно исходной каллусной культуры. На основе полученных данных можно предположить возможное участие Фл в регуляции роста культуры за счет их антиоксидантных или регуляторных свойств.

Установив схожие уровни ДГКВ корня интродуцированных растений и длительной культуры корня *in vitro*, мы повторно получили каллусные культуры от разных эксплантов (корень, гипокотиль, основание побега, семядоля) 5- и 14-дневных растений, выросших в пробирках (рис. 1а, 1б).

Наибольший относительный прирост сырой массы на 28 сутки и обводненность клеток

отмечены у гипокотильной линии, полученной от эксплантов 5-дневных растений (табл. 2). В то время как каллусные культуры, полученные от эксплантов более взрослых растений (14-дневных) имели меньший прирост сырой массы и обводненность, но большую сухую массу.

Биохимический анализ индивидуальных Фл показал, что каллус, полученный на основе более молодых тканей гипокотыля 5-дневных проростков, имел следовые количества изученных Фл (табл. 3). В то время как более зрелые ткани основания побега (нижняя часть стебля с почками) 14-дневных проростков формировали каллус с более высокими уровнями разных представителей Фл.

Отмечена специфика в накоплении индивидуальных Фл у разных линий каллусной культуры лихниса (табл. 3). В побеговой и корневой линиях культуры шестого пассажа содержалось одинаковое количество Р, тогда как в семядольной линии его количество было в 2 раза меньше. Корневая линия содержала КВ, уровень которого был в 1.5 раза меньше по сравнению с уровнем Р. В других культурах обнаружены только следовые количества КВ. Содержание ДГКВ в побеговом каллусе было в 13 раз больше такового в семядольной линии и в 4 раза больше, чем Р в анализируемой линии. Наибольший прирост сырой массы и обводненность клеток отмечены у гипокотильной линии, имеющей следовые ко-

личества изученных Фл. Тогда как наибольший прирост сухой массы семядольной культуры происходил на фоне меньшего содержания изученных групп Фл.

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования показали зависимость содержания ФС и Фл от физиологического состояния (возраста) листьев вегетирующих растений *L. chalcidonica* (табл. 1), что согласуется с ранее полученными нами данными для листьев разных ярусов *Lactuca sativa* [24]. Во взрослых и стареющих листьях *L. sativa* содержание Фл было в 4 и 6 раз выше соответственно, чем в молодых листьях [24]. Это свидетельствовало об усилении синтеза ВМ с завершением активного роста листа. Полученные нами данные согласуются также с информацией о фотоингибировании биосинтеза Фл на ранней стадии развития волокна *Gossypium hirsutum* в культуре *in vitro*, в то же время стимулировании этого процесса — на более поздних стадиях [25]. Однако непропорциональное увеличение уровня Фл у стареющих листьев *L. chalcidonica* относительно увеличения интенсивности ПОЛ, вероятно, было обусловлено подключением к стабилизации окислительного статуса тканей других антиоксидантных метаболитов, например, Про.

Таблица 2. Ростовые характеристики разных линий каллусной культуры лихниса на 28 сутки субкультивирования (6 пассаж)

Линия	Возраст проростков, сут	Эксплант	Относительный прирост FW	Содержание DW, %	Обводненность, %
5Г	5	гипокотиль	8.67 ± 0.50^a	6.72 ± 0.18^d	93.28 ± 0.18^a
14СЛ	14	семядольный лист	4.36 ± 0.20^c	8.64 ± 0.15^a	91.36 ± 0.15^d
14ОП	14	основание побега	5.51 ± 0.26^b	7.32 ± 0.23^c	92.68 ± 0.23^b
14К	14	корень	4.23 ± 0.25^c	7.80 ± 0.22^b	92.20 ± 0.22^c

Примечание. Одинаковыми надстрочными латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$.

Таблица 3. Содержание индивидуальных флавоноидов в разных линиях каллусной культуры лихниса на 28 сутки субкультивирования (6 пассаж)

Линия	Эксплант	Возраст проростков, сут	Содержание флавоноидов, мкг/г DW		
			рутин	кверцетин	дигидрокверцетин
5Г	гипокотиль	7	менее 0.01 ^c	менее 0.01 ^b	менее 0.01 ^c
14СЛ	семядоля	14	170.4 ± 24.7^b	менее 0.01 ^b	96.6 ± 14.5^b
14ОП	основание побега	14	333.7 ± 53.4^a	менее 0.01 ^b	1284.0 ± 115.0^a
14К	корень	14	394.5 ± 47.3^a	264.4 ± 39.7^a	менее 0.01 ^c

Примечание. Одинаковыми надстрочными латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$.

Взаимосвязь уровня ВМ с интенсивностью ростовых процессов также показана на культуре *in vitro*. Суммарное содержание ФС у суспензионной культуры корня лихниса на 14 сутки субкультивирования соответствовало уровню этих соединений у каллусной культуры корня на 28 сутки (табл. 4). При относительно меньшем (на 30%) приросте сырой массы суспензионной культуры (4.7 ± 0.3) на 14 сутки относительно каллусной культуры (6.75 ± 0.41) на 28 сутки отмечалось более раннее увеличение содержания ФС.

В то же время сравнение содержания индивидуальных Фл в этих культурах показало снижение уровня КВ в более быстрорастущей суспензионной культуре (рис. 3). Нельзя исключить и высвобождение в питательную среду Фл, содержание которых предполагаем изучить в дальнейшем. Полученные данные свидетельствуют о возможном участии КВ в регуляции роста суспензионной культуры. В соответствии с нашими более ранними исследованиями [26] показана зависимость конечного ростового индекса по сырой массе семядольной линии каллусной культуры *Saussurea orgaadayi* V. Khan. and Krasnob от суммарного содержания Фл. Максимальное 3.5-кратное увеличение конечного ростового индекса по сырой массе, отмеченное у каллусной культуры на питательной среде с 1 мкМ мета-хлорбензгидрилмочевины (индуктора монооксигеназной системы человека, ключевые ферменты которой относятся к суперсемейству цитохромов P-450 – CYP), происходило на фоне снижения суммы Фл на 83% [26]. Другими исследователями показано влияние Фл на регуляцию клеточного цикла [27, 28].

Самыми значимыми свойствами Фл как биологически важных активных компонентов считаются их антиоксидантные свойства и способность регулировать функции ферментов [29, 30]. Фл способны прямо или косвенно ослаблять или предупреждать клеточные повреждения, в том числе разрушение клеточных мембран, вызываемые свободными радикалами [30]. Фл могут осуществлять свой антиоксидантный эффект с помощью следующих механизмов: прямого скавенирования АФК и азота; редук-

ции альфа-токоферильных радикалов; активации антиоксидантных ферментов и/или низкомолекулярных антиоксидантов; хелатирования переходных металлов; ингибирования оксидаз. В зависимости от концентрации Фл и экзогенных факторов одни и те же Фл могут проявлять как антиоксидантные, так и прооксидантные свойства. В свою очередь небольшая степень оксидативного стресса, индуцируемая некоторыми Фл, активирует антиоксидантную защиту организма путем стимулирования экспрессии генов антиоксидантных ферментов и таким образом усиливает процессы цитопротекции.

В соответствии с данными других авторов существует тесная взаимосвязь между химической структурой и антиоксидантной активностью Фл, что лежит в основе различий активности изученных индивидуальных Фл [31]. КВ является более эффективным антиоксидантом по сравнению с ДГКВ. Предполагают, что именно наличие двойной связи между 2 и 3 углеродами в С-кольце у КВ необходимо для проявления ингибирующей активности. Так же показано, что КВ сильнее ингибирует ПОЛ и обладает более высокой радикал-защитной способностью, чем Р [32].

Известно, что рост клеток растений контролируется гормонами, прежде всего ауксинами. С другой стороны, Фл регулируют транспорт индол-3-уксусной кислоты (ИУК) и ее метаболизм [8, 33], что может отразиться на ростовых процессах. Производные КВ являются ингибиторами базипетального транспорта ауксина, гравитропизма и роста корня удлинением.

Показана зависимость роста клеточной культуры и биосинтеза ВМ от природы ауксинов [34]. 2,4-Д активирует пролиферацию, но снижает синтез ВМ, тогда как НУК вызывает цитодифференцировку, приводящую к замедлению и остановке роста культуры, но активирует образование вторичных соединений.

В исследовании Bota и Deliu [35] показана зависимость флавоноидного пути от цитокининов (ЦК). Дефект передачи сигналов ЦК индуцировал экспрессию нескольких регуляторных генов, таких как *MYB11*, *MYB111*, *PRODUCTION*

Таблица 4. Относительный прирост сырой массы и содержание фенольных соединений (ФС) в каллусной и суспензионной культурах лихниса

Тип культуры	Время культивирования, сут	Относительный прирост FW	Содержание ФС, мг/г DW
Каллусная	28	6.75 ± 0.46^a	10.72 ± 0.20^a
Каллусная	35	5.54 ± 0.26^b	9.11 ± 0.32^b
Суспензионная	14	4.75 ± 0.35^c	11.40 ± 0.80^a

Примечание. Одинаковыми надстрочными латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$.

OF ANTHOCYANIN PIGMENT 1 (PAP1/MYB75), PAP2/MYB90, TRANSPARENT TESTA GLABRA 2 (TTG2) и TT8, тем самым модулируя накопление флавонолов и антоцианов до и после стресса.

При выращивании клеточной культуры очень важно использовать оптимальное соотношение концентраций ауксинов и ЦК [34], поскольку ЦК в зависимости от природы и концентрации могут модулировать действие ауксинов.

В нашем эксперименте культуры *in vitro*, выращенные на МС-среде с 2 мг/л НУК и 0.5 мг/л 6-БАП, поддерживали активный рост и накопление Фл (табл. 4). Наши результаты согласуются с данными других авторов. Оценку эффективности соотношения ауксинов и ЦК для регуляции ВМ провели Liu и Saxena [36]. Авторы протестировали три ауксина (2,4-Д, ИУК, НУК) и один ЦК (БАП) в различных сочетаниях и концентрациях. Для всех вариантов отмечено увеличение количества Фл с возрастом суспензионных культур (14 дней субкультивирования). Наибольшая продукция Фл была достигнута в суспензионных культурах клеток *S. medusa* при использовании комбинации 2 мг/л НУК и 0.5 мг/л БАП [36]. Ауксины НУК и ИУК сильнее стимулировали биосинтез Фл, чем 2,4-Д. Увеличение концентрации ИУК и БАП значительно (в 3 раза) снижало количество Фл. Усиление продукции Фл показано также для суспензионной культуры *Digitalis lanata* после обработки 0.1 мг/л ИУК и 1 мг/л БАП [35], однако для другой линии этой культуры значимым была иная комбинация гормонов 0.1 мг/л НУК и 1 мг/л БАП. Нами ранее показано, что каллусная культура *S. orgadayi* двукратно увеличивала суммарное содержание эндогенных Фл при переходе от экспоненциального роста в стационарную фазу при субкультивировании на МС-среде, содержащей 0.8 мг/л 2,4-Д и 0.5 мг/л БАП [26].

Другими авторами показано, что рост и выработка биологически активных соединений клеточной суспензионной культурой *Elaeocarpus grandiflorus* сильно зависели не только от типа, но и концентрации регуляторов роста [37]. Наибольшая продукция Фл была получена в культурах клеток, поддерживаемых на среде WPM (Woody Plant Medium) с добавлением 2.5 ppm 2,4-Д (1.575 мг КВ/г DW), а наименьшая – 3.5 ppm 2,4-Д. Показана видоспецифичность в накоплении Фл представителями одного и того же рода. Производство Фл культурой *E. grandiflorus* ниже, чем производство Фл культурой *S. burahol* [38]. На уровень Фл влияет и содержание их предшественников. Было обнаружено, что каллусные культуры *Anthocephalus indicus*, выращенные на среде WPM с добавлением 3 мг/л БАП и 100 мг/л фенилаланина, продуцировали 77.2 ± 1.92 и 104.4 ± 4.39 мг Фл/г сухой массы соответственно [39].

Опираясь на данные гормональной регуляции пролиферации клеток и содержания Фл, нами планируется изучение эндогенного уровня фитогормонов (ауксинов и цитокининов) и содержания Фл в культурах *L. chalconica in vitro* и питательных средах.

Таким образом, нами показано, что молодая каллусная культура *L. chalconica* способна синтезировать БАВ, содержащиеся как в побегах, так и в корне интактных растений. На уровень Фл влияет возраст растений, с которых отделены экспланты. Установлена органный специфика в накоплении Р, КВ и ДКВ. На примере культуры *in vitro* показана динамика трех Фл при получении суспензионной культуры из каллусной культуры.

Исходя из полученных данных, можно заключить, что присутствие Фл в исследуемом эдистерон-содержащем виде *L. chalconica* делает его более перспективным для использования в качестве лекарственного сырья. Кроме того, каллусная и суспензионная культуры лихниса хальседонского являются полноценным заменителем растений природной популяции по содержанию трех исследованных Фл.

Данная работа была поддержана Программой развития Томского государственного университета (Приоритет 2030).

Авторы выражают благодарность центру “Физико-химические методы анализа” Томского политехнического университета за помощь в количественном определении флавоноидов.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 158 с.
2. Запрометов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. М.: Наука, 1993. 272 с.
3. Jiang N., Doseff A., Grotewold E. Flavones: from biosynthesis to health benefits // Plants. 2016. V. 5. P. 27. <https://doi.org/10.3390/plants5020027>
4. Kumar V., Suman U., Rubal, Kumar S.Y. Flavonoid secondary metabolite: biosynthesis and role in growth and development in plants // Recent trends and techniques in plant metabolic engineering / Eds. S. Yadav, V. Kumar, S. Singh. Springer Singapore. 2018. P. 19. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2251-8_2
5. Kitamura S. Transport of flavonoids: from cytosolic synthesis to vacuolar accumulation // The science of flavonoids / Eds. E. Grotewold. Springer. 2006. P. 123. https://doi.org/10.1007/978-0-387-28822-2_5

6. Petrucci E., Braidot E., Zancani M., Peresson C., Bertolini A., Patui S., Vianello A. Plant flavonoids – biosynthesis, transport and involvement in stress responses // Int. J. Mol. Sci. 2013. V. 14. P. 14950. <https://doi.org/10.3390/ijms140714950>
7. Li Y., Kong D., Fu Y., Sussman M.R., Wu H. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants // Plant Physiol. Biochem. 2020. V. 148. P. 80. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006>
8. Falcone Ferreyra M.L., Rius S.P., Casati P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications // Front. Plant Sci. 2012. V. 3. P. 222. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00222>
9. Носов А.М. Функции вторичных метаболитов растений *in vivo* и *in vitro* // Физиология растений. 1994. Т. 41. С. 873.
10. Зибарева Л.Н., Филоненко Е.С., Храмова Е.П. Флавоноиды некоторых видов растений родов *Lychnis* и *Silene* // Фенольные соединения: функциональная роль в растениях. Сборник научных статей по материалам X Международного симпозиума “Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты”, Москва, 2018. С. 274.
11. Нестерова Ю.В., Поветьева Т.Н., Зибарева Л.Н., Суслов Н.И., Зуева Е.П., Аксиненко С.Г., Афанасьева О.Г., Крылова С.Г., Амосова Е.Н., Рыбалкина О.Ю., Лопатина К.А. Противовоспалительная и анальгетическая активность комплекса флавоноидов *Lychnis chalcidonica* L. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017. Т. 163. № 2. С. 185.
12. Karnachuk R.A., Tishchenko S.Yu., Golovatskaya I.F. Endogenous phytohormones and regulation of morphogenesis of *Arabidopsis thaliana* by blue light // Russ. J. Plant Physiol. 2001. V. 48. P. 226. <https://doi.org/10.1023/A:1009060302835>
13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052>
14. Носов А.М. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / Под ред. Вл.В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. Москва: Бином. 2011. С. 386.
15. Zagorskina N.V., Dubravina G.A., Alyavina A.K., Goncharuk E.A. Effect of ultraviolet (UV-B) radiation on the formation and localization of phenolic compounds in tea plant callus cultures // Russ. J. Plant Physiol. 2003. V. 50. P. 270. <https://doi.org/10.1023/A:1022945819389>
16. Ломбоева С.С., Танхаева Л.М., Оленников Д.Н. Методика количественного определения суммарного содержания флавоноидов в надземной части ортилии однобокой (*Orthilia secunda* (L.) House) // Химия растительного сырья. 2008. № 2. С. 65.
17. Зимица Л.Н., Куркин В.А., Рыжов В.М. Исследование флавоноидного состава травы зверобоя пятилистного методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Медицинский альманах. 2012. Т. 2. С. 227. <https://doi.org/10.1023/A:1022945819389>
18. Шамц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии. Рига: Зинатне, 1988. 220 с.
19. Zhou X., Zeng M., Huang F., Qin G., Song Z. The potential role of plant secondary metabolites on antifungal and immunomodulatory effect // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2023. V. 107. P. 4471. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12601-5>
20. Marín L., Gutiérrez-Del-Río I., Entrialgo-Cadierno R., Villar C.J., Lombó F. De novo biosynthesis of myricetin, kaempferol and quercetin in *Streptomyces albus* and *Streptomyces coelicolor* // PLoS One. 2018. V. 13: e0207278. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207278>
21. Kojima E., Ohata S., Maruyama Y., Suzuki H., Shimozaka M., Taguchi G. Identification and characterization of a rhamnosyltransferase involved in rutin biosynthesis in *Fagopyrum esculentum* (common buckwheat) // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2018. V. 82. P. 1790. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1491286>
22. Buege J.A., Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation // Meth. Enzymol. 1978. V. 52. P. 302. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(78)52032-6)
23. Bates L.S., Waldran R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies // Plant Soil. 1973. V. 39. P. 205. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
24. Golovatskaya I.F., Boyko E.V., Vidershpan A.N., Laptev N.I. Age-dependent morphophysiological changes and biochemical composition of *Lactuca sativa* L. plants influenced by se and solar radiation of varying intensity // Agricultural Biology (Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya). 2018. V. 53. P. 1025. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.5.1025eng>
25. Qian S., Hong L., Cai Y., Gao J., Lin Y. Effects of light on *in vitro* fiber development and flavonoid biosynthesis in green cotton (*Gossypium hirsutum*) // Acta Soc. Bot. Pol. 2016. V. 85. P. 3499. <https://doi.org/10.5586/asbp.3499>
26. Golovatskaya I.F., Reznichenko A.E., Laptev N.I. Influence of meta-chlorobenzhydryl urea on physiological and biochemical characteristics of *Saussurea orgadai* V. Khan. and Krasnob. cell culture // Agricultural Biology [Sel'skokhozyaistvennaya biologiya]. 2021. V. 56. P. 602. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2021.3.602eng>
27. Galati G., Sabzevari O., Wilson J.X., O'Brien P.J. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics // Toxicology. 2002. V. 177. P. 91. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(02\)00198-1](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(02)00198-1)

28. Brunetti C., Di Ferdinando M., Fini A., Pollastri S., Tattini M. Flavonoids as antioxidants and developmental regulators: relative significance in plants and humans // Int. J. Mol. Sci. 2013. V. 14. P. 3540. <https://doi.org/10.3390/ijms14023540>
29. Kato A., Nasu N., Takebayashi K., Adachi I., Minami Y., Sanae F., Asano N., Watson A.A., Nash R.J. Structure-activity relationships of flavonoids as potential inhibitors of glycogen phosphorylase // J. Agric. Food Chem. 2008. V. 56. P. 4469.
30. Zverev Ya.F. Flavonoids through the eyes of a pharmacologist, antioxidant and anti-inflammatory activities // Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy. 2017. V. 15. P. 5. <https://doi.org/10.17816/RCF1545-13>
31. Sichel G., Corsaro C., Scalia M., Di Billo A.J., Bonomo R.P. In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O_2^- // Free Radic. Biol. Med. 1991. V. 11. P. 1.
32. Dugas A.J., Castaneda-Acosta Jr.J., Bonin G.C., Price K.L., Fischer N.H., Winston G.W. Evaluation of the total peroxyl radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships // J. Nat. Prod. 2000. V. 63. P. 327. <https://doi.org/10.1021/np990352n>
33. Lewis D.R., Ramirez M.V., Miller N.D., Vallabhaneni P., Ray W.K., Helm R.F., Winkel B.S.J., Muday G.K. Auxin and ethylene induce flavonol accumulation through distinct transcriptional networks // Plant Physiol. 2011. V. 156. P. 144. <https://doi.org/10.1104/pp.111.172502>
34. Klyushin A.G., Tomilova S.V., Kochkin D.V., Galishchev B.A., Nosov A.M. Effect of auxins and cytokinins on growth and biosynthetic characteristics of suspension cell culture of *Tribulus terrestris* L. // Russ. J. Plant Physiol. 2022. V. 69: 52. <https://doi.org/10.1134/S1021443722020078>
35. Bota C., Deliu C. Original article effect of plant growth regulators on the production of flavonoids by cell suspension cultures of *Digitalis lanata* // Farmacia. 2015. V. 63. P. 716.
36. Liu C.Z., Saxena P.K. *Saussurea medusa* cell suspension cultures for flavonoid production // Methods Mol. Biol. 2009. V. 547. P. 53.
37. Habibah N.A., Nugrahaningsih W.H., Anggraito Y.U., Mukhtar K., Wijayanti N., Mustafa F., Rostriana Y. Effect of growth regulators on cell growth and flavonoid production in cell culture of *Elaeocarpus grandiflorus* // Annual Conference on Environmental Science, Society and its Application. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. Indonesia, 2019. V. 391. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/391/1/012061>
38. Habibah N., Moeljopawiro S., Dewi K., Indrianto A. Flavonoid production, growth and differentiation of *Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook. F. and Th. cell suspension culture // Pak. J. Biol. Sci. 2017. V. 20. P. 197.
39. Indu S., Vijaya L., Meeta B., Jossy V., Naresh C. Production of flavonoids in callus culture of *Anthocephalus indicus* A. Rich. // Asian J. Plant Sci. 2013. V. 12. P. 40. <https://doi.org/10.3923/ajps.2013.40.45>