

УДК 581.19;581.14;58.08

КОФЕЙНАЯ КИСЛОТА В РАЗЛИЧНЫХ ФОРМУЛЯЦИЯХ КАК РЕГУЛЯТОР РОСТОВЫХ ПРОЦЕССОВ И УСТОЙЧИВОСТИ МИКРОКЛОНОВ КАРТОФЕЛЯ В КУЛЬТУРЕ *in vitro*

© 2023 г. Н. А. Еловская¹, *, Ж. Н. Калацкая¹, Н. А. Ламан¹,
В. В. Николайчук², А. Н. Красковский², К. С. Гилевская²

¹ Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск, 220072 Республика Беларусь

² Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск, 220141 Республика Беларусь

*e-mail: yalouskaya92@mail.ru

Поступила в редакцию 13.02.2023 г.

После доработки 03.04.2023 г.

Принята к публикации 29.04.2023 г.

Изучено влияние кофейной кислоты (КК), ее смеси с хитозаном (Хит+КК) и конъюгата с хитозаном (Хит-КК) на ростовые процессы и содержание пролина в микроклонах картофеля (*Solanum tuberosum* L.) в культуре *in vitro* в оптимальных условиях и в условиях продолжительного осмотического стресса, вызванного полиэтиленгликолем. Показано, что в оптимальных условиях конъюгат Хит-КК и в меньшей степени КК, действуя как стрессоры умеренной силы, ускоряли рост и развитие эксплантов картофеля и усиливали накопление пролина в стеблях. В условиях осмотического стресса КК и конъюгат Хит-КК способствовали повышению устойчивости микроклонов картофеля и поддержанию их активного роста, причем эффект сохранялся и в постстрессовый период. Впервые показано, что механическая смесь Хит+КК вызвала торможение роста и развития эксплантов и значительное накопление пролина, причем оказываемый ингибирующий эффект усугублялся в условиях стресса.

Ключевые слова: картофель (*Solanum tuberosum* L.), осмотический стресс, конъюгаты, хитозан, кофейная кислота, морфометрические показатели, пролин, *in vitro*

DOI: 10.31857/S0555109923050045, **EDN:** LJQPLM

В связи с мировой тенденцией ужесточения экологических требований к продуктам и товарам сельского хозяйства при разработке новых регуляторов роста растений все больше внимания уделяют природным биологически активным веществам, например, фенилпропаноидам и полисахаридам. Представителями первой группы являются гидроксикоричные кислоты, играющие определенную роль в регуляции прорастания семян, роста и развития проростков, формировании устойчивости растений к действию стрессоров. Кофейная кислота (КК) является ранним промежуточным звеном метаболизма фенилпропаноидов и предшественником многих вторичных соединений, регулирующих защитные реакции растений [1], и в зависимости от концентрации может стимулировать или замедлять рост растений [2].

Потенциал применения КК существенно ограничивается ее низкой растворимостью в воде [3]. Одним из способов изменения биодоступности КК и перспективным методом разработки новых препаративных форм с заданными свойствами

является ее связывание с полимерной матрицей-носителем. Одним из перспективных биополимеров является хитозан, представляющий собой продукт реакции деацетилирования природного полимера — хитина, важнейшего компонента клеточной стенки грибов и экзоскелета артропод [4, 5].

Хитозан оказывает стимулирующее действие на многие физиологические процессы растений [4, 6–8] и способствует повышению их устойчивости к неблагоприятным факторам среды различной природы за счет активизации комплекса защитных реакций [9, 10].

Хитозан не токсичен для живых организмов [11], биосовместим [12], полностью разлагается хитиназами микроорганизмов [13, 14], а многочисленные amino- и гидроксильные группы в его полимерной цепи обеспечивают широкие возможности для получения химически модифицированных производных, обладающих рядом новых свойств.

В настоящее время активно ведется синтез и исследование свойств соединений на основе хитозана

и фенольных соединений (например, феруловой, галловой и кофейной кислот). В работах [15, 16] производные хитозана с оксикоричными кислотами демонстрировали усиление антиоксидантной (АО) активности по сравнению с немодифицированным хитозаном, стимулировали накопление внутриклеточных антиоксидантных ферментов и проявляли антимикробную активность. Ковалентное связывание низкомолекулярных фенольных соединений с полимерной цепью хитозана обеспечивает повышение стабильности антиоксиданта, улучшение биодоступности и усиление его биологической активности [13].

Несмотря на большое количество работ, посвященных исследованию биологической активности химически модифицированного хитозана, данные о способности таких производных стимулировать процессы роста и развития растений немногочисленны. Так, обработка семян огурца [17] и пшеницы [18] увеличивала всхожесть, усиливала ростовую активность и способствовала снижению интенсивности окислительных процессов, а обработка семян редиса повышала содержание витамина С и снижала количество нитратов в корнеплодах [19].

Цель работы — исследование влияния конъюгата на основе хитозана и кофейной кислоты на ростовые процессы и содержание пролина в микроклонах картофеля в культуре *in vitro* в оптимальных условиях и в условиях осмотического стресса.

МЕТОДИКА

Объект исследования — растения-регенеранты картофеля (*Solanum tuberosum* L.) среднераннего сорта Бриз из коллекции Научно-практического центра Национальной академии наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству.

Оздоровленные методом апикальных меристем материнские растения клонировали в стерильных условиях ламинар-бокса “Белаквилон” (Беларусь) на питательную среду Мурасиге—Скуга (МС-среда). Полученные в результате клонального микроразмножения микрочеренки выращивали в течение 4 нед. при температуре 23–25°C в условиях искусственного освещения интенсивностью 3 тыс. люкс и при 16-часовом фотопериоде, после чего проводили измерение морфометрических параметров и замену МС-среды на модифицированные, содержащие конъюгат хитозан-кофейная кислота (Хит-КК, 0.025 мг/мл), отдельные соединения (хитозан, 0.025 мг/мл, КК, 0.025 мг/мл) и механическую смесь хитозана и КК (Хит + КК) в соотношении 1 : 1 с обязательной регулировкой pH ~ 5.7.

На модифицированных МС-средах микроклоны выращивали в течение 2 нед., после чего про-

водили повторное измерение морфометрических параметров. Часть микроклонов использовали для определения содержания пролина в стеблях, у оставшихся — проводили замену модифицированных МС-сред на стандартную. На 7 сут измеряли морфометрические параметры микроклонов и определяли содержание пролина в стеблях.

Конъюгат хитозана с КК получали карбодиймидным методом по методике, описанной в работе [17]. Для синтеза конъюгатов использовали хитозан с молекулярной массой (ММ) ~30 кДа, степенью деацетилирования 98.3% и степенью полимеризации ~186 (“Glenthams Life Sciences”, Великобритания), КК (ММ = 180.16 г/моль, “Sigma-Aldrich”, США) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиймид гидрохлорид (EDC, “Sigma-Aldrich”). Синтез конъюгата проводили при соотношении Хит : КК = 5 : 1 по массе, EDC брали в трехкратном мольном избытке по отношению к КК. Содержание КК в синтезированном конъюгате определяли спектрофотометрически, для чего снимали спектр поглощения конъюгата в области 200–400 нм и рассчитывали содержание КК по предварительно построенному калибровочному графику. Степень пришивки кофейной кислоты к хитозану составила $5.0 \pm 0.6\%$ или 53.8 ± 7.2 мкг/мг хитозана. Исследования молекулярной массы хитозана после введения КК не проводилось.

Осмотический стресс создавали добавлением в МС-среду высокомолекулярного полиэтиленгликоля (ПЭГ) с ММ ~ 6000 в концентрации 5%.

Содержание пролина определяли согласно методу, описанному в работе [20]. Навеску растительного материала (50 мг) растирали в 3%-ной сульфосалициловой кислоте и центрифугировали в течение 20 мин при 12000 г. К аликвоте супернатанта приливали ледяную уксусную кислоту и реактив на основе нингидрина в соотношении 1 : 1 : 1, нагревали в течение 60 мин при 90°C в термощейкере при постоянном перемешивании (300 об./мин). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре “Jasko V-630” (“Jasko”, Япония) при длине волны 515 нм.

Длину стебля и корней измеряли с помощью линейки, массу — взвешиванием на аналитических весах. Относительную скорость роста рассчитывали по формуле: $v_{\text{рост}} = (a_2 - a_1)/a_1 \times 100\%$, где $v_{\text{рост}}$ — относительная скорость роста, %; a_1 — длина при первом измерении, см; a_2 — длина при втором измерении, см.

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи программы Statistics 22. Для определения характера распределения использовали критерий Колмогорова—Смирнова. Оценку различий между группами выполняли при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим проведением

Таблица 1. Морфометрические показатели микроклонов картофеля, культивируемых на МС-средах с добавлением соединений хитозана и КК, и последующей их замене на стандартную МС-среду

Показатель		Вариант					НСР _{0.05}
		контроль	хитозан	КК	Хит + КК	Хит-КК	
Модифицированные МС-среды	Длина стебля, см	11.5 ± 0.15 ^a	9.8 ± 0.22 ^b	11.6 ± 0.13 ^a	10.8 ± 0.14 ^c	14.2 ± 0.20 ^d	0.26
	Число междоузлий, шт.	10.1 ± 0.12 ^a	9.5 ± 0.12 ^b	9.9 ± 0.12 ^a	10.3 ± 0.12 ^a	12.4 ± 0.20 ^c	0.20
	Сырая масса стебля, мг	116.1 ± 0.17 ^a	114.7 ± 0.76 ^b	124.7 ± 0.53 ^c	96.0 ± 0.56 ^d	151.9 ± 0.71 ^e	0.86
	Сухая масса стебля, мг	14.7 ± 0.02 ^a	12.9 ± 0.09 ^b	13.1 ± 0.06 ^c	11.6 ± 0.07 ^d	15.3 ± 0.07 ^e	0.16
	Длина корней, см	2.9 ± 0.09 ^a	2.6 ± 0.10 ^b	3.2 ± 0.05 ^c	3.0 ± 0.12 ^{ac}	3.9 ± 0.12 ^d	0.17
	Число корней, шт.	13.2 ± 0.20 ^a	10.3 ± 0.12 ^b	14.1 ± 0.12 ^c	11.7 ± 0.12 ^d	15.7 ± 0.12 ^e	0.20
	Сырая масса корней, мг	24.5 ± 0.59 ^a	30.5 ± 0.79 ^b	36.4 ± 0.65 ^c	34.3 ± 0.60 ^d	62.8 ± 0.43 ^e	0.90
	Сухая масса корней, мг	2.5 ± 0.06 ^a	3.0 ± 0.08 ^b	3.2 ± 0.06 ^c	3.7 ± 0.07 ^d	5.5 ± 0.04 ^e	0.08
Стандартная МС-среда	Длина стебля, см	12.5 ± 0.19 ^a	10.0 ± 0.12 ^b	13.4 ± 0.24 ^c	11.2 ± 0.25 ^d	15.0 ± 0.29 ^e	0.32
	Число междоузлий, шт.	11.0 ± 0.20 ^a	10.3 ± 0.12 ^b	11.7 ± 0.23 ^c	10.5 ± 0.12 ^b	13.6 ± 0.20 ^d	0.27
	Сырая масса стебля, мг	175.3 ± 0.64 ^a	118.7 ± 0.65 ^b	166.1 ± 0.38 ^c	118.3 ± 0.50 ^b	201.1 ± 0.99 ^d	0.96
	Сухая масса стебля, мг	13.5 ± 0.05 ^a	11.5 ± 0.06 ^b	13.4 ± 0.03 ^a	10.8 ± 0.05 ^c	16.2 ± 0.08 ^d	0.08
	Длина корней, см	3.6 ± 0.06 ^a	2.7 ± 0.14 ^c	3.4 ± 0.17 ^{ab}	3.2 ± 0.12 ^b	4.0 ± 0.12 ^d	0.20
	Число корней, шт.	16.3 ± 0.12 ^a	10.4 ± 0.20 ^b	14.4 ± 0.20 ^c	11.8 ± 0.20 ^d	16.6 ± 0.20 ^a	0.28
	Сырая масса корней, мг	65.0 ± 0.83 ^a	37.3 ± 0.30 ^b	43.6 ± 0.87 ^c	43.6 ± 0.73 ^c	73.6 ± 0.47 ^d	1.03
	Сухая масса корней, мг	5.7 ± 0.07 ^a	3.4 ± 0.03 ^b	4.1 ± 0.08 ^c	3.2 ± 0.05 ^d	6.9 ± 0.04 ^e	0.09

Примечание. Разные буквы латинского алфавита (a, b, c, d) обозначают наличие достоверной разницы между вариантами.

апостериорного теста (НСР — наименьшая значимая разница). Результаты представлены в виде $M \pm Sd$ (где M — это среднее арифметическое значение, Sd — стандартное отклонение) 3 биологических повторностей. В качестве критического уровня значимости использовали $p < 0.05$. Разные буквы латинского алфавита (a, b, c, d) использовали для обозначения достоверной разницы между вариантами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для пересадки на модифицированные МС-среды проводили отбор микроклонов со стандартными параметрами: длина стебля (8.6 ± 0.07 см), длина корней (2.3 ± 0.07 см), число междоузлий (8.2 ± 0.07 шт.), число корней (10.3 ± 0.07 шт.).

Стабильное развитие растений в культуре *in vitro* характеризовалось такими показателями, как высота стебля микроклонов и число сформированных метамеров (междоузлий). Микроклоны картофеля, культивируемые в течение 2 нед. на модифицированной МС-среде с Хит-КК, характеризовались активным ростом и накоплением биомассы по сравнению с контролем и другими опытными вариантами. Положительный эффект конъюгата Хит-КК выявлен и после замены МС-среды на стандартную — все исследуемые морфометрические

параметры были выше контрольных значений, что могло свидетельствовать о пролонгированном действии конъюгата.

Внесение в МС-среду КК усиливало рост корней, способствовало формированию их большего количества и накоплению биомассы по сравнению с контролем, однако, оказанный эффект, был слабее, чем конъюгата Хит-КК. После недельного выращивания на стандартной МС-среде длина стебля и число междоузлий микроклонов (вариант КК) превышали контрольные значения на 7.2 и 6.4% соответственно, но наблюдалось замедление накопления биомассы и дальнейший рост корневой системы относительно контроля (табл. 1).

Хитозан негативно воздействовал на развитие микроклонов картофеля, о чем свидетельствовало снижение по сравнению с контролем всех исследуемых параметров роста. При этом механическая смесь хитозана и кофейной кислоты оказывала неоднозначное действие, замедляя рост стебля, но усиливая рост и накопление биомассы корней микроклонов. Результаты, полученные после замены модифицированных МС-сред на стандартную, показали, что микроклоны из вариантов Хитозан и Хит + КК характеризовались замедленным ростом по сравнению с и с контролем и опытными вариантами (табл. 1).

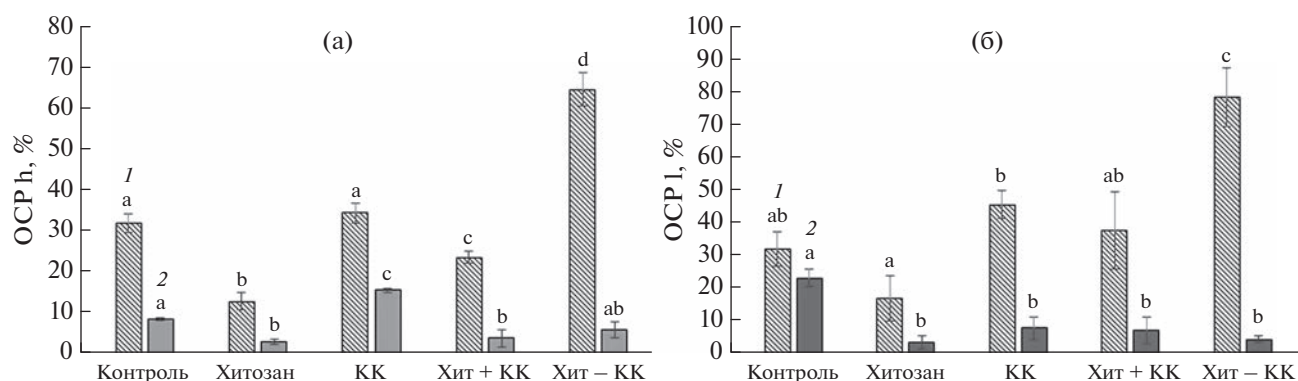


Рис. 1. Относительная скорость роста стебля ((а), $OSР_h$) и – относительная скорость роста корневой системы микроклонов ((б), $OSР_r$) в течение 2-недельного выращивания на модифицированных МС-средах (1) и недельного выращивания на стандартной МС-среде (2).

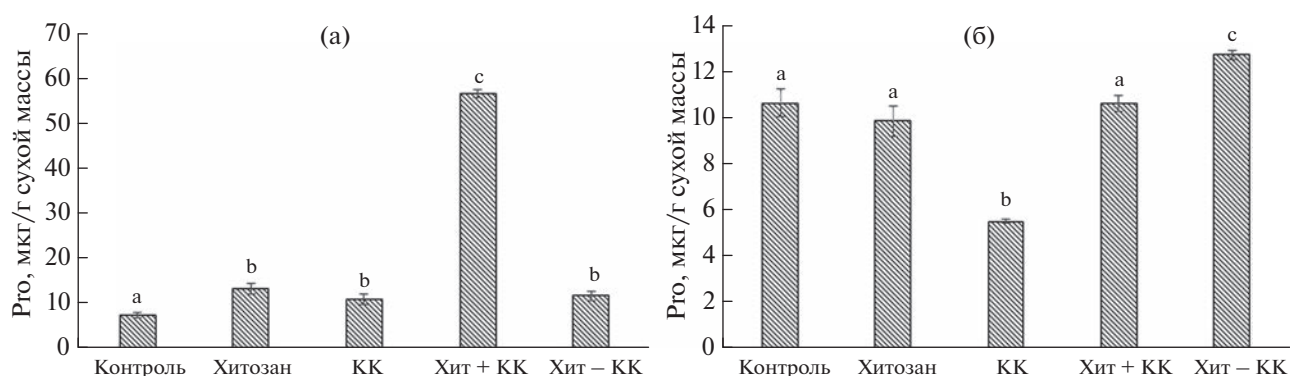


Рис. 2. Содержание пролина (Pro) в стеблях микроклонов картофеля после 2-недельного выращивания на модифицированных МС-средах (а) и недельного выдерживания на стандартной МС-среде (б).

Для понимания характера воздействия добавок, КК на развитие микроклональных растений принимали во внимание не только абсолютные, но и относительные значения величин. Относительная скорость роста ($OSР$) характеризовала изменение выбранного параметра (например, высоты стебля, длины корневой системы, биомассы) за определенный промежуток времени (в классическом представлении – прирост на единицу биомассы). Относительная скорость линейного роста стебля микроклонов ($OSР_h$) после 2-недельного выращивания на модифицированных МС-средах увеличивалась в 2 раза под влиянием Хит-КК (рис. 1а). Расчет относительной скорости роста корневой системы микроклонов ($OSР_r$) показал увеличение в 1.4 и 1.2 раза по сравнению с контролем под действием КК и Хит-КК соответственно (рис. 1б).

Содержание пролина в стеблях микроклонов после 2-недельного выращивания на модифицированных МС-средах повышалось во всех опытных вариантах по отношению к контролю, наи-

более значительно 1.8 раза под воздействием смеси Хит + КК (рис. 2а).

Индукция синтеза пролина может происходить не только при действии на растение абиотических стрессоров, но и, так называемых сигнальных посредников [21], например, при обработке растений салициловой кислотой [22], брассиностероидами [23], хитозаном [24]. Выявленное в данном исследовании увеличение содержания пролина в стеблях микроклонов картофеля опытных вариантов, вероятно, связано как с элиситорной природой хитозана, так и с действием КК, оказывающей неоднозначное действие на содержание пролина [25].

После замены модифицированных МС-сред и недельного выдерживания микроклонов на стандартной МС-среде относительная скорость роста в вариантах хитозан и Хит + КК оставалась ниже, чем у контрольных растений, а содержание пролина в стеблях микроклонов картофеля этих вариантов снижалось до уровня контрольных значений (рис. 2б). В то же время в варианте КК активный рост микрорастений сохранялся и в 1.8

раза превышал скорость роста растений в контроле, при этом выявлено самое низкое содержание пролина по сравнению с другими исследуемыми вариантами. В варианте Хит-КК при пересадке и выращивании на стандартной среде микроклубеньки оставались самыми крупными, с хорошо развитой корневой системой, но активность роста микроклубеньков резко снижалась по сравнению с их ростом на модифицированной среде. Показатель $ОСР_h$ оставался на уровне контрольных значений (рис. 1а), а скорость роста корней значительно уменьшалась (рис. 1б). В этом варианте содержание пролина незначительно повысилось после переноса на стандартную среду культивирования. Вероятно, резкое ингибирование роста и вызвало увеличение его содержания как по отношению к значениям, регистрируемым на модифицированной МС-среде, так и ко всем вариантам на стандартной среде (рис. 2б). Относительная скорость роста корневой системы микроклубеньков картофеля также уменьшилась и в других опытных вариантах (рис. 1б). Вероятно, исследуемые добавки оказывали ингибирующее воздействие различной силы на рост и развитие микроклубеньков картофеля. При этом хитозан, а особенно механическая смесь хитозана с КК, проявляли синергетическое действие, вызывая замедление роста и развития, сопровождающееся значительным накоплением пролина. В варианте Хит + КК оно возрастало практически в 6 раз по сравнению с контролем. Ингибирование роста и развития микроклубеньков продолжалось и при замене на стандартную среду, что, вероятно, связано с тем, что хитозан расщеплялся ферментами растений до более мелких фрагментов, обладающих большей проникающей способностью, обеспечивая длительный эффект [26]. Однако отсутствие в среде культивирования соединений, вызывающих замедление роста, способствовало снижению содержания пролина до уровня значений контрольных растений на стандартной среде.

КК и конъюгат Хит-КК, добавленные в среду для культивирования микроклубеньков ускоряли рост и развитие растений, повышая содержания пролина в его тканях на 57.6 и 45.9% относительно контроля. Высокая относительная скорость роста при пересадке на стандартную среду сохранялась также у растений, культивируемых на среде с КК, причем при активном росте содержание пролина снижалось как по отношению к показателям, полученным на модифицированной среде, так и ниже значений в контроле на стандартной среде. При замене модифицированной среды с конъюгатом КК-Хит, на стандартную среду скорость роста микроклубеньков существенно замедлялась до значений у контрольных растений, что вызывало, вероятно, повышение содержания пролина.

При замедлении скорости роста растений содержание пролина в тканях существенно увеличивалось, а при активации роста растений и

эффекте стимуляции в отсутствии активатора, напротив, увеличение его содержания не было столь значительно или могло оставаться на уровне контрольных значений или снижаться.

Известно, что развитие устойчивости растительного организма повышает также и резистентность к сопутствующему повреждающему стрессору (кросс-адаптация), в основе которой лежит функционирование механизмов регуляции водного и окислительного статуса организма.

В связи с этим проведено исследование влияния добавок КК и хитозана на рост и развитие микроклубеньков в условиях абиотического стресса.

После продолжительного осмотического стресса, вызванного действием 5%-ного высокомолекулярного ПЭГ, выявлено замедление развития микроклубеньков картофеля всех опытных вариантов по сравнению с оптимальным контролем без ПЭГ (табл. 2).

Добавленные в МС-среду хитозан и Хит + КК усиливали негативное воздействие ПЭГ на рост и развитие микроклубеньков, о чем свидетельствовало замедление роста побегов и практически полная остановка роста корневой системы как по отношению к оптимальному контролю, так и по отношению к стрессовому контролю (ПЭГ). КК и Хит-КК, в свою очередь, способствовали снижению негативного действия осмотического стресса и повышали устойчивость микроклубеньков, причем эффект наблюдался и после прекращения действия стресс-фактора (табл. 2).

В условиях осмотического стресса относительная скорость линейного роста стеблей микроклубеньков ($ОСР_h$) снижалась во всех опытных вариантах по отношению к оптимальному контролю, однако КК и Хит-КК способствовали поддержанию процессов роста по отношению к стрессовому контролю (рис. 3а).

Рост корневой системы микроклубеньков прекращался при включении в среду культивирования ПЭГ, а также — при совместном действии ПЭГ и хитозана (ПЭГ/Хитозан), в то время как добавленные КК и Хит-КК способствовали усилению скорости роста корневой системы даже по сравнению с оптимальным-контролем (рис. 3б).

После прекращения действия стресс-фактора и переноса микроклубеньков на стандартную среду культивирования относительная скорость роста оставалась низкой в варианте опыта с хитозаном. Активный рост побегов микроклубеньков был отмечен в варианте Хит-КК: по относительной скорости роста растения в этом варианте опыта превосходили микроклубеньки из оптимального контроля. В остальных вариантах скорость роста микроклубеньков достигала уровня значений стрессового контроля.

Рост корневой системы микроклубеньков в репарационный период в вариантах с применением

Таблица 2. Морфометрические показатели микроклонов картофеля, культивируемых в условиях осмотического стресса на модифицированных МС-средах с добавлением соединений хитозана и КК

Показатель		Вариант						НСР _{5%}
		контроль	ПЭГ	ПЭГ/Хитозан	ПЭГ/КК	ПЭГ/Хит + КК	ПЭГ/Хит-КК	
Осмотический стресс	Длина стебля, см	11.5 ± 0.15 ^a	9.1 ± 0.21 ^b	9.0 ± 0.16 ^b	10.1 ± 0.11 ^c	9.0 ± 0.28 ^b	11.1 ± 0.04 ^d	0.34
	Число междоузлий, шт.	10.1 ± 0.12 ^a	9.0 ± 0.20 ^b	8.1 ± 0.12 ^c	9.9 ± 0.12 ^a	8.4 ± 0.20 ^d	9.9 ± 0.12 ^a	0.26
	Сырая масса стебля, мг	116.1 ± 0.17 ^a	76.5 ± 0.45 ^b	61.9 ± 0.52 ^c	84.8 ± 0.73 ^d	62.1 ± 0.49 ^c	82.8 ± 0.14 ^e	0.84
	Сухая масса стебля, мг	14.7 ± 0.02 ^a	9.4 ± 0.06 ^b	8.5 ± 0.07 ^c	12.5 ± 0.11 ^d	8.5 ± 0.07 ^c	10.3 ± 0.02 ^e	0.11
	Длина корней, см	2.9 ± 0.09 ^a	2.3 ± 0.16 ^b	2.3 ± 0.24 ^b	3.6 ± 0.11 ^c	2.5 ± 0.05 ^b	3.3 ± 0.10 ^d	0.24
	Число корней, шт.	13.2 ± 0.20 ^a	10.3 ± 0.12 ^b	10.3 ± 0.12 ^b	11.1 ± 0.12 ^c	10.5 ± 0.12 ^b	12.9 ± 0.12 ^d	0.24
	Сырая масса корней, мг	24.5 ± 0.59 ^a	22.3 ± 0.60 ^b	18.6 ± 0.84 ^c	27.4 ± 0.49 ^d	23.1 ± 0.65 ^b	50.9 ± 0.37 ^e	1.05
	Сухая масса корней, мг	2.5 ± 0.06 ^a	3.0 ± 0.08 ^b	2.5 ± 0.11 ^a	4.3 ± 0.08 ^c	3.4 ± 0.10 ^d	6.1 ± 0.04 ^e	0.16
Репарационный период	Длина стебля, см	12.5 ± 0.19 ^a	9.8 ± 0.12 ^b	9.2 ± 0.18 ^c	11.2 ± 0.16 ^d	9.7 ± 0.09 ^b	13.7 ± 0.21 ^e	0.29
	Число междоузлий, шт.	11.0 ± 0.20 ^a	10.0 ± 0.20 ^b	9.3 ± 0.12 ^c	11.2 ± 0.20 ^a	8.9 ± 0.12 ^d	12.2 ± 0.20 ^e	0.31
	Сырая масса стебля, мг	175.3 ± 0.64 ^a	119.7 ± 0.56 ^b	99.9 ± 0.49 ^c	97.4 ± 0.52 ^d	91.7 ± 0.43 ^e	124.6 ± 0.31 ^f	0.91
	Сухая масса стебля, мг	13.5 ± 0.05 ^a	13.5 ± 0.06 ^a	11.0 ± 0.05 ^b	11.2 ± 0.06 ^c	10.2 ± 0.05 ^d	15.6 ± 0.04 ^e	0.10
	Длина корней, см	3.6 ± 0.06 ^a	2.3 ± 0.16 ^b	2.3 ± 0.24 ^b	3.7 ± 0.17 ^a	2.7 ± 0.22 ^c	3.5 ± 0.12 ^a	0.30
	Число корней, шт.	16.3 ± 0.12 ^a	10.3 ± 0.12 ^b	10.3 ± 0.12 ^b	12.6 ± 0.20 ^c	10.5 ± 0.12 ^b	14.7 ± 0.23 ^d	0.28
	Сырая масса корней, мг	65.0 ± 0.83 ^a	32.6 ± 0.88 ^b	31.2 ± 0.87 ^b	39.2 ± 5.56 ^c	43.8 ± 3.15 ^e	63.8 ± 0.81 ^a	4.82
	Сухая масса корней, мг	5.7 ± 0.07 ^a	3.3 ± 0.09 ^b	3.6 ± 0.10 ^{bc}	4.1 ± 0.58 ^c	3.6 ± 0.26 ^b	5.8 ± 0.07 ^a	0.49

Примечание. Разные буквы латинского алфавита (a, b, c, d) обозначают наличие достоверной разницы между вариантами.

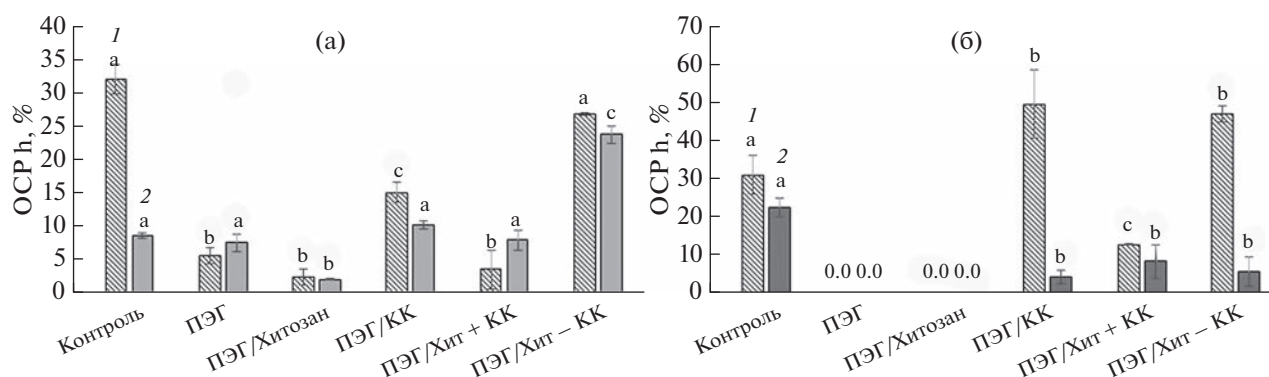


Рис. 3. Относительная скорость роста стебля ((а), $ОСР_h$) и относительная скорость роста их корневой системы ((б), $ОСР_r$) микроклонов картофеля в течение 2-недельного выращивания на модифицированных МС-средах в условиях стресса (1) и в репарационный период (2).

ПЭГ и ПЭГ/Хит не восстанавливался, $ОСР_r$ в вариантах КК и Хит-КК значительно замедлялась, а в варианте Хит + КК не изменялась по сравнению со стрессовым периодом, вызванным ПЭГ (рис. 3б).

Одним из надежных биометрических показателей, характеризующим не только онтогенетическое развитие растительного организма, но и уровень его реакции на действие факторов окружающей среды, является отношение длины корней к длине стебля. В условиях осмотического стресса добавленные в среду культивирования КК и конъюгат Хит-КК способствовали увеличению этого показателя как по сравнению с оптимальным, так и стрессовым (с ПЭГ) контролями (рис. 4).

В репарационный период наблюдалось замедление ростовых процессов микроклонов, что приводило к стабилизации исследуемого отношения: не было выявлено достоверных различий опытных вариантов по сравнению с оптимальным и стрессовым (ПЭГ) контролями (рис. 4).

Увеличение отношения длины корней к длине стебля можно рассматривать в качестве типичной реакции проявления устойчивости растений к дефициту влаги и развивающемуся, в связи с этим, осмотическому стрессу, что свидетельствовало о повышении водопоглощающей способности растений [27].

В условиях стресса, вызванного добавлением ПЭГ в среду, содержание пролина увеличивалось во всех опытных вариантах по отношению к оптимальному контролю (рис. 5а). Значительное увеличение пролина наблюдали в вариантах с добавлением КК, причем его максимальное количество отмечено варианте Хит + КК, с самой низкой относительной скоростью роста микроклонов.

После прекращения действия стресс-фактора содержание пролина в опытных вариантах снижалось, однако оставалось выше контроля, не подвергнувшегося осмотическому стрессу, причем в

вариантах Хит + КК и Хит-КК его содержание оставалось выше, чем в стрессовом контроле (рис. 5б).

Известно, что усиление синтеза пролина и активизация его транспорта между компартментами клетки и частями растения является одной из первичных и универсальных реакций растения на стресс-воздействие [27]. Показано, что КК и конъюгат Хит-КК, добавленные в среду культивирования, усиливали синтез пролина в растениях в условиях осмотического стресса. Его повышенное содержание отмечалось и в репарационный период после снятия стрессовой нагрузки, при этом сохранялся активный рост и развитие растений. При добавлении Хит + КК, значительно усиливающих накопление пролина (в 4 раза по сравнению с добавлением ПЭГ), отмечено торможение относительной скорости роста микрокочеренков.

Таким образом, КК и в большей мере конъюгат Хит-КК, вероятно, можно рассматривать как сла-

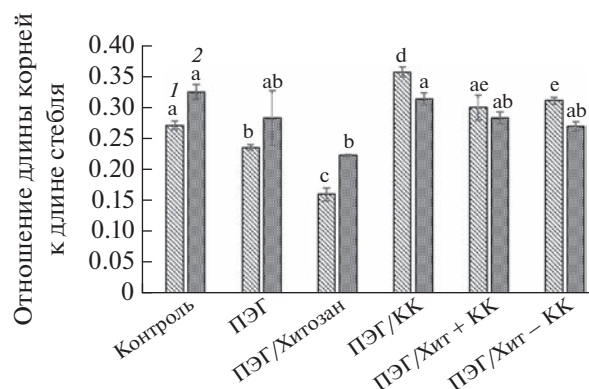


Рис. 4. Отношение длины корней к длине стебля микроклонов картофеля, выращенных в условиях двухнедельного осмотического стресса ((1), 5% ПЭГ) и в репарационный период (2).

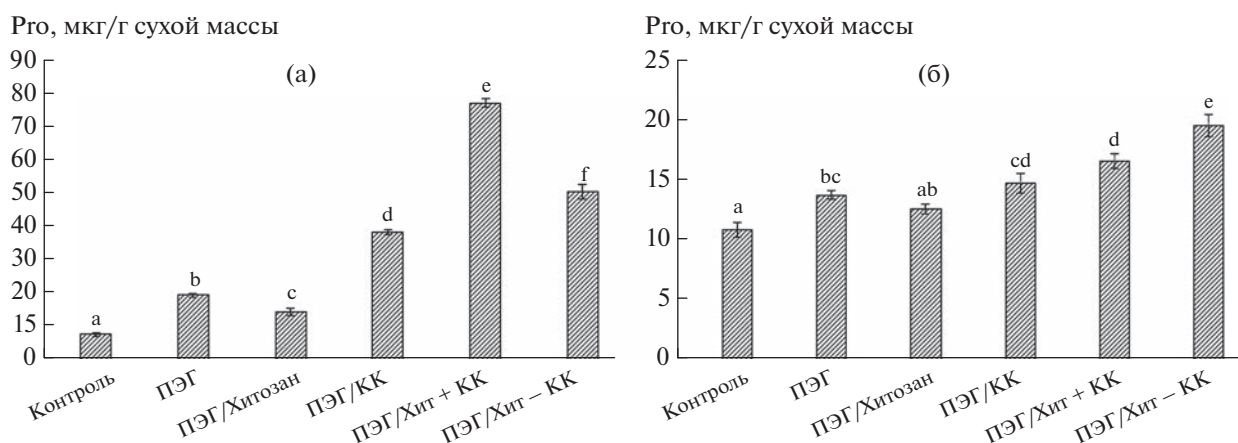


Рис. 5. Содержание пролина (Pro) в стеблях микроклонов картофеля после 2-недельного осмотического стресса (а) и недельного репарационного периода (б).

бые стрессоры, запускающие активацию адаптационных процессов в растениях с пролонгирующим эффектом к последующим абиотическим стрессовым воздействиям, в результате чего рост и развитие растений активировались и поддерживались в неблагоприятных условиях культивирования. При этом добавка КК стимулировала синтез пролина в растительной ткани, который еще в большей мере усиливается в условиях абиотического стресса и сохранялся в репарационный период. Механическая смесь Хит + КК, вероятно, также являлась сильным стрессовым фактором, вызывающим торможение или даже остановку роста микроклонов, значительное накопление пролина, что усугублялось при действии осмотического стресса.

Известно, что оксикоричные кислоты обладают ярко выраженными антиоксидантными свойствами [29], снижая образование активных форм кислорода за счет хелатирования металлов с переменной валентностью, нейтрализации свободных радикалов [30] и активации антиоксидантных ферментов [29]. Внесенная в МС-среду смесь КК и ее производных достоверно усиливала ростовые процессы микроклональных растений картофеля и стевии (*Stevia rebaudiana* Bertoni) [31, 32]. Под воздействием стрессовых факторов разной природы КК может включаться в фенилпропаноидный путь, изменяя направление синтеза собственных производных, усиливая образование фенольных соединений в целом [33].

Несмотря на то, что хитозан активно исследуют в качестве потенциального рост- и иммуностимулирующего соединения [34, 35], оказываемый им эффект неоднозначен и во многом определяется его молекулярной массой, степенью полимеризации и дезацетилирования, концентрацией, условиями окружающей среды, а также видом и возрастом растения [4, 9, 10, 36].

Выявленная реакция микроклонов картофеля на хитозан, вероятно, связана с его элиситорной активностью, приводящей к замедлению роста, а наложение второго негативного фактора — абиотического стресса, вызванного ПЭГ, практически полностью подавляло рост растений.

В свою очередь, ковалентное связывание хитозана с фенольными соединениями способствует снижению элиситорных свойств хитозана за счет уменьшения свободных аминогрупп и увеличению антиоксидантных свойств фенольных соединений за счет их стабилизации [13], что, по-видимому, и приводит к стимуляции развития микро-растений картофеля и повышению их устойчивости, поддерживая активный рост в условиях осмотического стресса и в репарационный период.

Ранее было показано [19], что ковалентное связывание хитозана с КК позволяет значительно повысить антирадикальную активность по сравнению с исходным полимером и КК (на 30%) с учетом степени модификации и в пересчете на ее массу. Кроме того, КК в составе конъюгата устойчива к воздействию окисляющих факторов окружающей среды в отличие от нативной кислоты, деградация которой может достигать 40–50% [37]. Таким образом, механизм синергетического действия конъюгата Хит-КК на ростовые процессы растений картофеля и формирование устойчивости к недостатку влаги обусловлен составом (полимер-антиоксидант) и структурой самого конъюгата. Благодаря полимерной матрице, вероятно, обеспечивается пролонгированное воздействие КК на функциональное состояние растительной клетки.

Кроме того, в результате конъюгирования хитозана с КК происходили изменение конформации полимерной цепи полисахарида, формирование новой системы водородных связей и увеличение гидродинамического диаметра и электрокине-

ческого потенциала [37], что стало причиной иного по сравнению с исходным полимером характера взаимодействия Хит-КК с растительным организмом.

Конъюгат Хит-КК может рассматриваться как экобезопасный регулятор роста и иммуномодулятор, ускоряющий рост и развитие эксплантов картофеля и способствующий повышению устойчивости растений и поддержанию их активного роста в стрессовых условиях и в постстрессовый период.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Б22М-037).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Batish D.R., Singh H.P., Kaur Sh., Kohli R.K., Yadav S.S. // J. Plant Physiol. 2008. V. 165. № 3. P. 297–305.
2. Li H.H., Inoue M., Nishimura H., Mizutani J., Tsuzuki E. // J. Chem. Ecol. 1993. V. 19. № 8. P. 1775–1787.
3. Agatemor Ch., Ibsen K.N., Tanner E.E.L., Mitragotry S. // Bioeng. Trans. Med. 2018. V. 3. № 1. P. 7–25.
4. Asghari-Zakaria R., Maleki-Zanjani B., Sedghi E. // Plant Soil Environ. 2009. V. 55. № 6. P. 252–256.
5. Khayrova A., Khayrova A., Lopatin S., Varlamov V. // Int. J. Sci. 2019. V. 8. P. 81–86.
6. Thamilarasan V., Sethuraman V., Gopinath K., Balakshmi C., Govindarajan M., Mothana R.A. et al // J. Clust. Sci. 2018. V. 29. P. 375–384.
7. Salachna P., Byczyńska A., Jeziorska I., Udyecz E. // World Sci. News. 2017. V. 62. P. 111–123.
8. Faqir Y., Ma J., Chai Y. // Plant Soil Environ. 2021. V. 12. P. 679–699.
9. Chirkov S.N. // Appl. Biochem. Microbiol. 2002. V. 38. № 1. P. 1–8.
10. El Hadrami A., Adam L.R., El Hadrami I., Daayf F. // Mar. Drugs. 2010. V. 4. № 4. P. 968–987.
11. Zayed M., Elkafafi S., Zedan A., Dawoud S. // J. Plant Prod. 2017. V. 8. № 5. P. 577–585.
12. Hassan F.A.S., Ali E., Gaber A., Fetouh M.I., Mazrou R. // Plant Physiol. Biochem. 2021. V. 162. P. 291–300.
13. Варламов В.П., Ильина А.В., Шагдарова Б.Ц., Луньков А.П., Мысякина И.С. // Успехи биологической химии. 2020. Т. 60. С. 317–368.
14. Ullah N., Basit A., Ahmad I., Ullah I., Shah S.T., Mohamed H.I. et al // Bull Natl Res Cent. 2020. V. 44. № 1. <https://doi.org/10.1186/s42269-020-00435-4>
15. Sun Y., Ji X., Cui J., Mi Y., Zhang J., Guo Zh. // Mar. Drugs. 2022. V. 20. № 8. P. 489. <https://doi.org/10.3390/md20080489>
16. Nagy V., Sahariah P., Hjalmarsdottir M.A., Masson M. // Carbohydr. Polym. 2022. V. 277. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118896>
17. Недведь Е.Л., Калацкая Ж.Н., Овчинников И.А., Рыбинская Е.И., Красковский А.Н., Николайчук В.В. и др. // Прикл. биохимия и микробиология. 2022. Т. 58. № 1. С. 74–82.
18. Kraskouski A., Nikalaichuk V., Kulikouskaya V., Hileuskaya K., Kalatskaja J., Nedved H. et al // Soft Mater. 2021. V. 19. № 4. P. 495–502.
19. Гилевская А.Е., Николайчук В.В., Красковский А.Н., Гилевская К.С., Куликовская В.И., Калацкая Ж.Н. и др. // Прикл. биохимия и микробиология. 2022. Т. 58. № 2. С. 195–205.
20. Шихалеева Г.Н., Будняк А.К., Шихалеев И.И., Иващенко О.Л. // Вестник ХНУ. Сер. Биология. 2014. Т. 21. № 1112. С. 168–172.
21. Колупаев Ю.Е., Вайнер А.А., Ястреб Т.О. // Вестник ХНУ. Серия Биология. 2014. Вып. 2. № 32. С. 6–22.
22. Mishra S., Dubey R.S. // J. Plant Physiol. 2006. V. 163. P. 927–936.
23. Ozdemir F., Bor M., Demiral T., Turkan I. // Plant Growth Regul. 2004. V. 42. P. 203–211.
24. Muley A.B., Shingote P.R., Patil A.P., Dalvi S.G., Suprasanna P. // Carbohydr. Polym. 2019. V. 210. P. 289–301.
25. Пузина Т.И., Макеева И.Ю. // Агрохимия. 2015. № 6. С. 53–58.
26. Попова Э.В., Домнина Н.С., Коваленко Н.М., Борисова Е.А., Колесников Л.Е., Тютерев С.Л. // Вестник защиты растений. 2017. Т. 3. № 93. С. 28–33.
27. Acosta-Motos J.R., Ortuno M.F., Bernal-Vicente A., Diaz-Vivancos P., Sanchez-Blanco M.J., Hernandez J.A. // Agronomy. 2017. V. 7. 18 p.
28. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Кабашишникова Л.Ф. // Прикл. биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 5. С. 419–440.
29. Rivero R.M., Ruiz J.M., Garcia P.C., Lopez-Lefebre L.R., Sanchez E., Romero L. // Plant Sci. 2001. V. 160. P. 315–321.
30. Siquet C., Paiva-Martins F., Lima J.L., Reis S., Borges F. // Free Radic. Res. 2006. V. 40. P. 433–442.
31. Булдаков С.А., Шегорев О.В. // Картофель и овощи. 2014. № 2. С. 25–27.
32. Шульгина А.А., Калашишникова Е.А. // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. 2017. Т. 20. № 6. С. 46–50.
33. Budna G.A., Lima R.B., Zanardo D.Y., dos Santos W.D., Ferrarese M., Ferrarese-Filho O. // J. Plant Physiol. 2011. V. 168. № 14. P. 1627–1633.
34. Riseh R.S., Hassanisaadi M., Vatankhah M., Babaki S.A., Barka E.A. // Int. J. Biol. Macromol. 2022. V. 220. P. 998–1009.
35. Chakraborty M., Hasamezzaman M., Rahman M., Khan M.A.R., Bhowmik P., Mahmud N.U. et al. // Agriculture. 2020. V. 10. № 12. 624. <https://doi.org/10.3390/agriculture10120624>
36. Тютерев С.Л. // Вестник защиты растений. 2015. № 1. Вып. 83. С. 3–13.
37. Nikalaichuk V., Hileuskaya K., Kraskouski A., Kulikouskaya V., Nedved H., Kalatskaja J. et al. // J. Appl. Polym. 2021. V. 139. № 14. <https://doi.org/10.1002/app.51884>

Caffeic Acid in Various Formulations as a Growth and Resistance Regulator of Potato Microclones in *in vitro* Culture

N. A. Yalouskaya^{a, *}, J. N. Kalatskaja^a, N. A. Laman^a, V. V. Nikalaichuk^b,
A. N. Kraskouski^b, and K. S. Hileuskaya^b

^a Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, 220072 Republic of Belarus

^b Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220141 Republic of Belarus
*e-mail: yalouskaya92@mail.ru

The article discusses the influence of caffeic acid (CA), its mix with chitosan (CHT + CA) and chitosan-based conjugate (CHT-CA) on growth and proline content of microclone potato plants (*Solanum tuberosum* L.) in *in vitro* culture under optimal conditions and under prolonged osmotic stress caused by polyethylene glycol. Under optimal conditions CHT-CA and CA, acting as moderate strength stressors, accelerate the growth and development of potato microclones and increase the proline accumulation in the stems. Under osmotic stress CA and CHT-CA promote the resistance of potato microclones and maintain their active growth. And such effect persists during the reparation period. The mechanical mix CHT + CA causes inhibition of microclonal plants' growth and development accompanied by a significant accumulation of proline which is aggravated under stress.

Keywords: potato (*Solanum tuberosum* L.), osmotic stress, conjugate, chitosan, caffeic acid, morphometric parameters, proline