

ISSN 1561-8323 (Print)  
ISSN 2524-2431 (Online)

УДК 581.19; 581.14  
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-6-605-613>

Поступило в редакцию 07.04.2022  
Received 07.04.2022

Н. А. Еловская<sup>1</sup>, Ж. Н. Калацкая<sup>1</sup>, академик Н. А. Ламан<sup>1</sup>, К. С. Гилевская<sup>2</sup>,  
В. И. Куликовская<sup>2</sup>, В. В. Николайчук<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси,  
Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси,  
Минск, Республика Беларусь

### СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ОКСИКОРИЧНЫХ КИСЛОТ И ИХ КОНЬЮГАТОВ С ХИТОЗАНОМ НА РОСТ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ МИКРОКЛОНОВ КАРТОФЕЛЯ *IN VITRO*

**Аннотация.** Рассматривается влияние кофейной и феруловой кислот и их конъюгатов на основе хитозана на ростовые и отдельные биохимические показатели микроклонов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Бриз в культуре *in vitro*. Выявлен их положительный эффект на рост и развитие растений, при этом максимальное стимулирующее действие наблюдали у кофейной кислоты и ее конъюгата. Добавление хитозана в питательную среду культивирования вызвало развитие оксидативного стресса в клетках микроклональных растений. Оксикоричные кислоты проявили антиоксидантные свойства, снижая образование активных форм кислорода и стресс-индуцируемое накопление пролина. Конъюгат хитозана и кофейной кислоты действовал как умеренной силы стрессор, активизируя метаболизм и адаптационные процессы у формирующихся микроклональных растений.

**Ключевые слова:** картофель, *in vitro*, конъюгаты, оксикоричные кислоты, хитозан, морфометрические показатели, фотосинтетические пигменты, пролин, перекись водорода, перекисное окисление липидов

**Для цитирования.** Стимулирующее действие оксикоричных кислот и их конъюгатов с хитозаном на рост и биохимические показатели микроклонов картофеля *in vitro* / Н. А. Еловская [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2022. – Т. 66, № 6. – С. 605–613. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-6-605-613>

Ninel A. Yaloukaya<sup>1</sup>, Joanna N. Kalatskaja<sup>1</sup>, Academician Nikolai A. Laman<sup>1</sup>, Kseniya S. Hileuskaya<sup>2</sup>,  
Viktoryia I. Kulikouskaya<sup>2</sup>, Viktoryia V. Nikalaichuk<sup>2</sup>

<sup>1</sup>V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus,  
Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

### EFFECT OF THE HYDROXYCINNAMIC ACIDS AND THEIR CHITOSAN-BASED CONJUGATES ON THE GROWTH AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF MICROCLONE POTATO PLANTS *IN VITRO*

**Abstract.** This study determined the effect of exogenously applied hydroxycinnamic acids and their chitosan-based conjugates on growth and biochemical parameters of microclone potato plants (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro* under optimal conditions. The findings of the present investigation confirm applying of chitosan-caffeic acid and chitosan-ferulic acid conjugates on microclone potato plants to improve growth and development. A significant growth-stimulating effect was found in caffeic acid and its chitosan-based conjugate. Chitosan behaved like a general elicitor inducing oxidative stress in plant cells. In turn, hydroxycinnamic acids acted as antioxidants to scavenge reactive oxygen species. The chitosan-caffeic acid conjugate can be considered as a low stress factor that activates metabolism and adaptation processes of microclonal potato plants.

**Keywords:** potato, *in vitro*, conjugates, hydroxycinnamic acids, chitosan, morphometric parameters, photosynthetic pigments, proline, hydrogen peroxide, lipid peroxidation

**For citation.** Yaloukaya N. A., Kalatskaja J. N., Laman N. A., Hileuskaya K. S., Kulikouskaya V. I., Nikalaichuk V. V. Effect of the hydroxycinnamic acids and their chitosan-based conjugates on the growth and biochemical parameters of microclone potato plants *in vitro*. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2022, vol. 66, no. 6, pp. 605–613 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-6-605-613>

**Введение.** Физиологически активные вещества природного происхождения активно используются для создания препаратов, регулирующих рост растений, активизирующих иммунные реакции и участвующих в формировании комплексной индуцированной устойчивости к биотическим и абиотическим стрессовым факторам. В качестве компонентов таких препаратов

используются соединения, способные даже в низких концентрациях оказывать существенное положительное воздействие на физиологические процессы растений. Например, хитозан – линейный полиаминосакхарид, деацетилированное производное хитина, оказывающий стимулирующее действие на ростовые процессы многих сельскохозяйственных культур, усиливая синтез фотосинтетических пигментов, сахаров, вторичных метаболитов и антиоксидантов и повышая устойчивость культур к неблагоприятным абиотическим и биотическим факторам среды [1–3].

В настоящее время многие исследователи большое внимание уделяют химической модификации хитозана с использованием фенольных соединений, которые ковалентно сшиваются с его полимерной цепью. Ковалентная сшивка с полисахаридом является одним из способов стабилизации фенольного соединения и улучшения его биодоступности. Показано, что наиболее целесообразно получать такие производные на основе низкомолекулярных фенольных соединений [3].

Однако пока еще недостаточно сведений о биологической активности производных хитозана с полифенолами, их действии на рост и развитие растений в оптимальных и неблагоприятных условиях. В связи с этим цель данной работы заключалась в исследовании влияния конъюгатов на основе хитозана и оксикоричных кислот на ростовые и биохимические процессы микроклонов растений картофеля в культуре *in vitro* в оптимальных условиях.

**Материалы и методы исследования.** Исходные оздоровленные растения-регенеранты картофеля сорта Бриз, предоставленные РУП «НПЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству», клонировали и полученные микроклоны помещали на агаризованные питательные среды согласно схеме опыта:

Контроль – стандартная питательная среда Мурасиге–Скуга (МС-среда);

Хитозан – МС-среда с добавлением хитозана  $M = 30$  кДа,  $c_{\text{хитозана}} = 0,025$  мг/мл;

Кофейная кислота (КК) – МС-среда с добавлением кофейной кислоты,  $c_{\text{КК}} = 0,025$  мг/мл;

Хитозан-кофейная кислота (Хит-КК) – МС-среда с добавлением конъюгата хитозан-кофейная кислота,  $c_{\text{конъюгат}} = 0,025$  мг/мл;

Феруловая кислота (ФК) – МС-среда с добавлением феруловой кислоты,  $c_{\text{ФК}} = 0,025$  мг/мл;

Хитозан-феруловая кислота (Хит-ФК) – МС-среда с добавлением конъюгата хитозан-феруловая кислота,  $c_{\text{конъюгат}} = 0,025$  мг/мл.

Растения выращивали при температуре 23–25 °С, в фотопериоде 16 ч день и 8 ч ночь, освещенности 3000 люкс.

На 28-й день выращивания оценивали ростовые процессы по показателям длины и массы стеблей, накоплению фотосинтетических пигментов, хлорофилльному фотосинтетическому потенциалу (ХФСП) микроклонов; развитие – по числу сформировавшихся междоузлий (метамеров).

Фотосинтетические пигменты экстрагировали 96 %-ным этиловым спиртом и рассчитывали согласно [4], ХФСП определяли по методу, изложенному в [5], перекись водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) по цветной реакции с ксиленовым оранжевым [6]. Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по накоплению малонового диальдегида (МДА) [7]. Содержание пролина определяли по цветной реакции с нингидрином [8].

Конъюгаты хитозана с кофейной или феруловой кислотой синтезировали в Институте химии новых материалов НАН Беларуси карбодиимидным методом, изложенным в [9]. Степень пришивки оксикоричной кислоты к хитозану составила  $41,8 \pm 3,9$  мкг/мг (или  $3,6 \pm 0,3$  %) и  $48,9 \pm 6,5$  мкг/мг (или  $4,5 \pm 0,7$  %) для феруловой и кофейной кислот соответственно.

Статистическая обработка проводилась с использованием программы Statistics 22. Количественные данные проверяли на нормальность распределения с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. Оценку различий между вариантами выполняли при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с учетом критерия Брауна–Форсайта с последующим проведением апостериорного теста (сравнение частных средних по тесту Дункана). Результаты представлены в виде  $M \pm Sd$  (где  $M$  – это среднее арифметическое значение,  $Sd$  – стандартное отклонение) трех биологических повторностей. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ . Конъюгаты сравнивали с контролем, хитозаном и соответствующей оксикоричной

кислотой, сравнение конъюгатов или оксикоричных кислот друг с другом не проводили. Буквы латинского алфавита (a, b, c, d) указывают на наличие достоверных различий между вариантами.

**Результаты и их обсуждение.** Добавление в питательную среду конъюгата на основе хитозана и кофейной кислоты (Хит-КК) оказывало самое высокое стимулирующее действие на рост и развитие микроклонов картофеля. Длина стебля и число междоузлий под действием Хит-КК увеличились соответственно на 33,4 и 22,9 % по сравнению со стандартной средой, на 17,1 и 11,4 % по сравнению с добавлением хитозана и на 5,0 и 6,6 % относительно варианта с кофейной кислотой. Внесение конъюгата Хит-КК положительно действовало на накопление сырой и сухой биомассы стеблей. Исследуемые показатели увеличились на 22,5 % (по сырой массе) и 61,1 % (по сухой массе) по сравнению с контролем. Статистически достоверные различия не получены для вариантов с добавлением Хит-КК, хитозана и кофейной кислоты (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Влияние конъюгатов Хит-КК и Хит-ФК на морфометрические показатели растений-регенерантов картофеля сорта Бриз в культуре *in vitro*

Table 1. The effect of chitosan-caffeic acid and chitosan-ferulic acid conjugates on the morphometric parameters of potato regenerated plants in *in vitro*

Вариант/Показатель Option/Indicator	МС-среда (контроль) MS-medium (control)	МС-среда + MS-medium +				
		Хитозан Chitosan	КК Caffeic acid	Хит-КК Chitosan-caffeic acid	ФК Ferulic acid	Хит-ФК Chitosan-ferulic acid
Длина стебля, см	3,8 ± 0,15 <sup>a</sup>	4,4 ± 0,03 <sup>b</sup>	4,9 ± 0,1 <sup>c</sup>	5,1 ± 0,15 <sup>d</sup>	4,1 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,0 ± 0,1 <sup>a</sup>
Число междоузлий, шт.	6,1 ± 0,10 <sup>a</sup>	6,7 ± 0,06 <sup>b</sup>	7,0 ± 0,15 <sup>c</sup>	7,5 ± 0,10 <sup>d</sup>	7,0 ± 0,06 <sup>c</sup>	6,6 ± 0,17 <sup>b</sup>
Сырая масса стебля, мг	75,69 ± 3,25 <sup>a</sup>	88,91 ± 2,52 <sup>b</sup>	93,12 ± 2,73 <sup>b</sup>	92,74 ± 7,52 <sup>b</sup>	90,15 ± 1,26 <sup>b</sup>	78,20 ± 2,93 <sup>a</sup>
Сухая масса стебля, мг	5,89 ± 1,34 <sup>a</sup>	7,95 ± 0,23 <sup>b</sup>	8,82 ± 0,26 <sup>b</sup>	9,49 ± 0,77 <sup>b</sup>	8,45 ± 0,19 <sup>b</sup>	7,94 ± 0,3 <sup>b</sup>
Длина корней, см	3,4 ± 0,11 <sup>a</sup>	3,2 ± 0,09 <sup>a</sup>	4,4 ± 0,14 <sup>b</sup>	5,0 ± 0,15 <sup>c</sup>	3,8 ± 0,06 <sup>b</sup>	4,1 ± 0,16 <sup>c</sup>
Число корней, шт.	4,7 ± 0,06 <sup>a</sup>	4,6 ± 0,06 <sup>a</sup>	8,2 ± 0,17 <sup>b</sup>	5,2 ± 0,06 <sup>c</sup>	6,7 ± 0,36 <sup>b</sup>	4,1 ± 0,12 <sup>c</sup>
Сырая масса корней, мг	28,32 ± 0,40 <sup>a</sup>	15,05 ± 3,02 <sup>b</sup>	39,48 ± 1,35 <sup>c</sup>	33,64 ± 1,82 <sup>d</sup>	33,96 ± 0,86 <sup>c</sup>	27,92 ± 0,26 <sup>a</sup>
Сухая масса корней, мг	3,22 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,88 ± 0,38 <sup>b</sup>	5,40 ± 0,18 <sup>c</sup>	4,13 ± 0,22 <sup>d</sup>	3,85 ± 0,10 <sup>c</sup>	3,45 ± 0,03 <sup>a</sup>

**Примечания:** конъюгаты сравнивались с контролем, хитозаном и соответствующей оксикоричной кислотой, сравнение конъюгатов или оксикоричных кислот друг с другом не проводилось. Разные буквы латинского алфавита свидетельствуют о наличии достоверной разницы между вариантами,  $p < 0,05$ .

**Note:** the conjugates were compared with the control, chitosan and the corresponding hydroxycinnamic acid, the conjugates and hydroxycinnamic acids were not compared with each other. Different letters indicate means that are statistically significantly different at 5 % level of significance.

В то же время добавление в питательную среду конъюгата Хит-ФК стимулировало формирование большего числа междоузлий на стебле микроклонов по сравнению с контролем (на 8,2 %), хотя данный показатель оказался на 5,3 % ниже эффекта ФК (табл. 1). Добавление в питательную среду конъюгата Хит-ФК не оказывало действия на накопление сырой биомассы побегов по сравнению с контролем, но снижало ее на 12,1 и 13,3 % по сравнению с хитозаном и ФК соответственно. Сухая биомасса микроклонов возрастала под влиянием вносимого в питательную среду конъюгата Хит-ФК на 34,6 % по сравнению с контролем, но не изменялась по сравнению с растениями, культивировавшимися на средах с добавлением хитозана и ФК (табл. 1).

Наиболее существенный эффект на развитие корневой системы оказала кофейная кислота как по сравнению с контрольными растениями, так и с растениями, выращиваемыми на питательной среде с конъюгатом. При добавлении Хит-КК средняя длина корней увеличилась на 45,7 % по отношению к контролю и на 54,1 и 14,6 % по сравнению с вариантами с добавлением хитозана и кофейной кислоты, а число корней возросло на 10,6 и 12,9 % по сравнению с контролем и хитозаном соответственно. Сырая масса корней под действием конъюгата Хит-КК увеличилась на 18,8 и 123,5 % по сравнению с контролем и хитозаном и снизилась на 14,8 % по сравнению с кофейной кислотой соответственно. Хит-КК стимулировал накопление сухой био-

массы по сравнению с контролем (на 28,2 %) и хитозаном (на 119,0 %), но уступал на 23,7 % варианту с кофейной кислотой (табл. 1).

Конъюгат Хит-ФК оказывал неоднозначный эффект на развитие корневой системы микроклонов: средняя длина корней увеличилась на 18,5, 25,3 и 6,9 %, в то время как число корней уменьшилось на 14,1, 12,2 и 39,3 % по сравнению с контролем, хитозаном и ФК соответственно. Добавление конъюгата Хит-ФК в питательную среду не оказало влияния и на биомассу корней по сравнению с контролем, но увеличило их сырую и сухую биомассу на 85,5 и 83,6 % по сравнению с хитозаном (табл. 1).

Анализ полученного экспериментального материала показывает, что варианты с добавлением кофейной кислоты и ее конъюгата с хитозаном демонстрируют самые высокие эффекты стимуляции практически по всем показателям роста, развития и продукционного процесса микроклонов картофеля (табл. 1). Интересным для дальнейшего изучения представляется статистически достоверное ускорение развития растений (по числу сформированных метамеров) при добавлении в среду выращивания конъюгата Хит-КК по сравнению со всеми другими вариантами опыта.

Феруловая кислота и ее конъюгат с хитозаном оказали стимулирующее влияние преимущественно на рост корневой системы растений, причем действие феруловой кислоты оказалось более эффективным. Хитозан способствовал ускорению роста побегов, однако ингибировал формирование корневой системы микроклонов.

Известно, что оксикоричные кислоты в низких концентрациях стимулируют корнеобразование в результате предотвращения декарбоксилирования фитогормона индол-3-уксусной кислоты. Также показано, что феруловая и кофейная кислоты, содержащие гидроксил в пара-положении, проявляют антагонистический эффект в отношении абсцизовой кислоты в сравнении с коричной кислотой [10].

Исследования Ли с соавт. [11] показали положительное влияние хитозана на проростки сои, при этом эффективность действия хитозана была прямо пропорциональна его молекулярной массе. Так, замачивание семян в растворе хитозана с высокой молекулярной массой (>1000 кДа) стимулировало рост проростков сои. С другой стороны, в исследованиях Луан с соавт. [12] стимулирующий эффект был получен при использовании низкомолекулярного хитозана (16 кДа).

Значительный ростстимулирующий эффект обработки семян конъюгатами на основе хитозана и оксикоричных кислот получен при выращивании растений огурца, при этом отмечено изменение соотношения развития надземной и подземной частей проростка в сторону увеличения корневой системы [9], преимущественное влияние конъюгатов хитозана и оксикоричных кислот на корневую систему проростков ячменя показано также в [13].

Добавление в питательную среду конъюгата на основе хитозана и кофейной кислоты увеличивало суммарное содержание хлорофиллов на 31,4 % по сравнению с контролем и снижало на 32,6 % по сравнению с кофейной кислотой. Отношение содержания Хл *a* к Хл *b* увеличивалось у растений, выращенных на МС-среде с добавлением хитозана и феруловой кислоты на 10,5 и 11,9 % по сравнению с контролем. Изменение соотношения Хл *a* к Хл *b* может свидетельствовать об ультраструктурной перестройке хлоропластов и потенциальном стрессовом воздействии.

Хит-ФК не оказывал влияния на суммарное содержание хлорофиллов по сравнению с контролем и хитозаном. Отношение Хл *a* к Хл *b* не изменялось при добавлении конъюгата Хит-ФК по сравнению с контролем и опытными вариантами (табл. 2).

Известно, что существует тесная положительная корреляция между скоростью роста растений и количеством хлорофилла в накопленной биомассе. Эта зависимость количественно выражается в форме хлорофилльного фотосинтетического потенциала (ХФСП). ХФСП микроклона показывает, сколько хлорофилла *a* и *b* приходится на единицу массы растения. Наиболее высокими значениями потенциала характеризовались микроклоны, выращенные на МС-средах с добавлением КК и ФК (в 2,7 и 2,3 раза выше контроля соответственно). В варианте с конъюгатом Хит-КК рассматриваемый показатель увеличился в 2,0 и 1,2 раза по сравнению с контролем и хитозаном, Хит-ФК – в 1,3 раз по сравнению с контролем соответственно (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Влияние конъюгатов Хит-КК и Хит-ФК на содержание фотосинтетических пигментов (мг/г сухой массы) в стеблях микроклонов картофеля *in vitro*  
 T a b l e 2. The effect of chitosan-caffeic acid and chitosan-ferulic acid on the photosynthetic pigments content (mg/g dry weight) in the stems of potato microclones *in vitro*

Вариант/Показатель Option/Indicator	Контроль Control	Хитозан Chitosan	КК Caffeic acid	Хит-КК Chitosan-caffeic acid	ФК Ferulic acid	Хит-ФК Chitosan-ferulic acid
Хл <i>a</i> + Хл <i>b</i>	4,84 ± 0,41 <sup>a</sup>	6,58 ± 0,07 <sup>b</sup>	9,49 ± 0,04 <sup>c</sup>	6,40 ± 0,44 <sup>b</sup>	7,90 ± 0,64 <sup>c</sup>	5,39 ± 1,12 <sup>ab</sup>
Хл <i>a</i> / Хл <i>b</i>	2,19 ± 0,12 <sup>a</sup>	2,42 ± 0,15 <sup>b</sup>	2,45 ± 0,01 <sup>b</sup>	2,10 ± 0,16 <sup>ab</sup>	2,41 ± 0,005 <sup>a</sup>	2,32 ± 0,18 <sup>a</sup>
ΣХл / Каротиноиды	4,54 ± 0,25 <sup>a</sup>	5,64 ± 0,14 <sup>b</sup>	6,34 ± 0,11 <sup>c</sup>	4,87 ± 0,35 <sup>ab</sup>	5,97 ± 0,18 <sup>b</sup>	4,27 ± 0,27 <sup>a</sup>
ХФСП	0,03 ± 0,007 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,001 <sup>b</sup>	0,08 ± 0,002 <sup>c</sup>	0,06 ± 0,007 <sup>b</sup>	0,07 ± 0,006 <sup>c</sup>	0,04 ± 0,009 <sup>b</sup>

П р и м е ч а н и я: конъюгаты сравнивались с контролем, хитозаном и соответствующей оксикоричной кислотой, сравнение конъюгатов друг с другом не проводилось. Разные буквы латинского алфавита свидетельствуют о наличии достоверной разницы между вариантами,  $p < 0,05$ .

N o t e s: the conjugates were compared with the control, chitosan and the corresponding hydroxycinnamic acid, the conjugates and hydroxycinnamic acids were not compared with each other. Different letters indicate means that are statistically significantly different at 5 % level of significance.

Процесс роста микроклонов во многом определяется степенью сформированности фотосинтетического аппарата и содержанием основных пигментов, участвующих в процессе преобразования световой энергии. Оксикоричные кислоты и хитозан способствовали накоплению суммы хлорофиллов и увеличению хлорофилльного фотосинтетического потенциала в растениях по сравнению с контролем, однако действие оксикоричных кислот оказалось более эффективным.

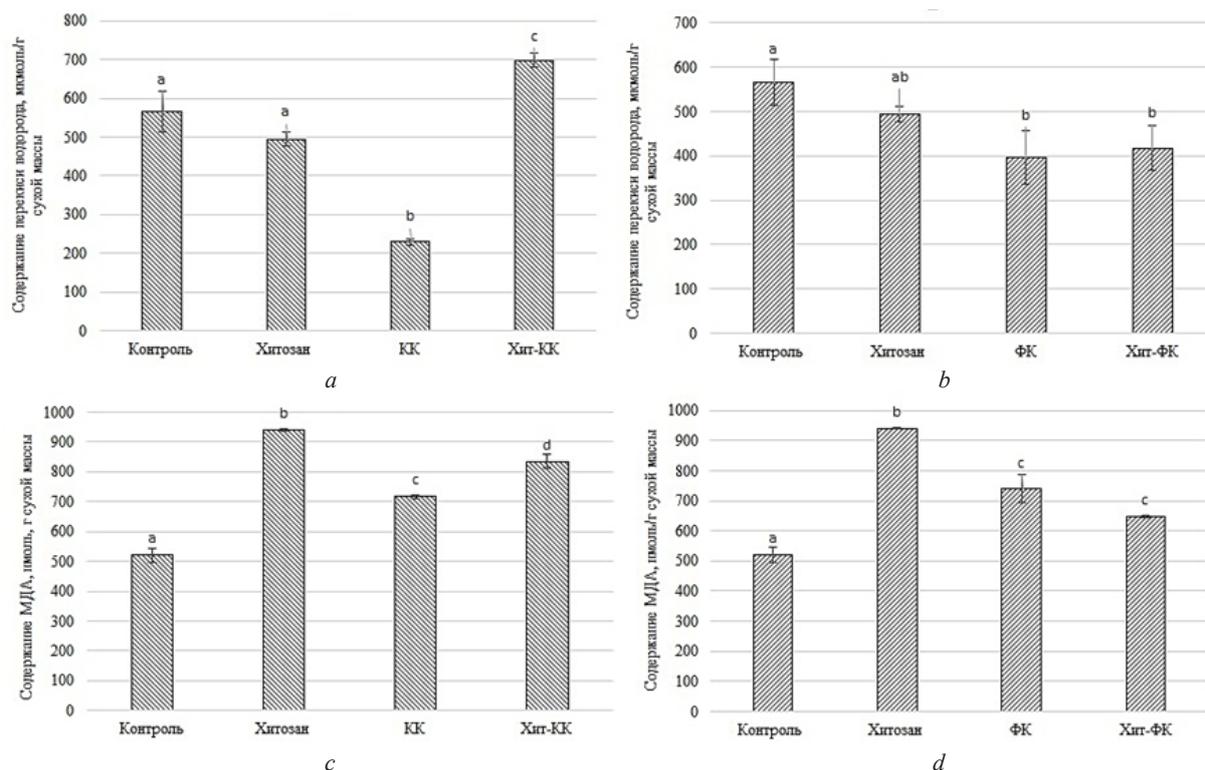
Вместе с тем в вариантах КК и Хит-КК, где сформировались микроклоны с самыми высокими и практически одинаковыми значениями по суммарной сухой биомассе стеблей и корней, показатель ХФСП в варианте с КК в 1,3 раза выше, чем с Хит-КК. Однако если рассчитать количество биомассы, приходящееся на единицу хлорофилла, получаем диаметрально противоположную зависимость – значение показателя в варианте Хит-КК в 1,4 раза выше, чем в КК. Можно предположить, что добавление в среду выращивания Хит-КК способствует формированию более оптимальной структуры фотосинтетического аппарата микроклонов, что обеспечивает высокие скорости накопления биомассы при расчете на единицу хлорофилла и развития растений.

Добавление в среду выращивания оксикоричных кислот и их конъюгатов с хитозаном сопровождается существенными изменениями биохимических показателей растений. Анализ содержания перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) в стеблях микроклонов показал, что добавление в питательную среду конъюгата Хит-КК усиливает ее образование на 23,6, 41,1 и 203,6 % по сравнению с контролем, хитозаном и КК (рисунок, *a*). Обратный эффект был выявлен при использовании конъюгата Хит-ФК: содержание перекиси водорода снизилось на 26,1 % по сравнению с контролем (рисунок, *b*).

Применение хитозана значительно стимулировало накопление продуктов перекисного окисления липидов. Оба конъюгата снижали содержание МДА по сравнению с хитозаном. Однако при сравнении с контролем и оксикоричными кислотами под влиянием конъюгатов содержание МДА повышалось на 60,4 и 16,4 % по сравнению с контролем и КК (рисунок, *c*) и на 24,5 % по сравнению с контролем (рисунок, *d*).

Конъюгат Хит-КК и кофейная кислота, добавляемые в питательные среды, снижали уровень пролина в стеблях по сравнению с контролем на 64,9 и 66,6 % соответственно, в то время как хитозан стимулировал накопление пролина на 53,6 %. Аналогичное влияние на содержание пролина оказывал и конъюгат Хит-ФК (табл. 3).

Конъюгат Хит-КК увеличивал содержание пролина и в корнях микроклонов на 35,4 % по сравнению с контролем, однако снижал на 52,0 % по сравнению с хитозаном. В корнях микроклонов картофеля, культивируемых на среде с добавлением кофейной кислоты, отмечен самый низкий уровень пролина (табл. 3). Добавление конъюгата Хит-ФК снижает уровень пролина в корнях на 29,3, 74,9 и 31,0 % по сравнению с контролем, хитозаном и феруловой кислотой соответственно (табл. 3).



Влияние конъюгатов на содержание перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) (*a* – для Хит-КК; *b* – для Хит-ФК) и малонового диальдегида (МДА) (*c* – для Хит-КК; *d* – для Хит-ФК) в микроклонах картофеля сорта Бриз *in vitro*. Разные буквы латинского алфавита свидетельствуют о наличии достоверной разницы между вариантами,  $p < 0,05$

The effect of chitosan and hydroxycinnamic acids conjugates on the hydrogen peroxide (*a* – Chitosan-caffeic; *b* – Chitosan-ferulic) and MDA contents in the stems of potato microclones in *in vitro* (*c* – Chitosan-caffeic; *d* – Chitosan-ferulic). Different letters above the error bars means that are statistically significantly different at 5 % level of significance

Т а б л и ц а 3. Влияние конъюгатов Хит-КК и Хит-ФК на содержание пролина в стеблях и корнях микроклонов картофеля сорта Бриз *in vitro*  
 T a b l e 3. The effect of chitosan-caffeic acid and chitosan-ferulic acid on the proline content in the stems and the roots of potato microclones *in vitro*

Вариант/Содержание пролина Variant/Proline content	Контроль Control	Хитозан Chitosan	КК Caffeic acid	Хит-КК Chitosan-caffeic acid	ФК Ferulic acid	Хит-ФК Chitosan-ferulic acid
Стебли, мкг/г сухой массы	23,93 ± 1,45 <sup>a</sup>	36,78 ± 2,30 <sup>b</sup>	8,41 ± 2,69 <sup>c</sup>	8,00 ± 3,44 <sup>c</sup>	10,01 ± 1,66 <sup>c</sup>	13,20 ± 2,04 <sup>c</sup>
Корни, мкг/г сухой массы	14,22 ± 0,24 <sup>a</sup>	40,13 ± 2,25 <sup>b</sup>	1,62 ± 0,04 <sup>c</sup>	19,25 ± 1,23 <sup>d</sup>	14,58 ± 2,55 <sup>a</sup>	10,06 ± 1,14 <sup>c</sup>

П р и м е ч а н и я: конъюгаты сравнивались с контролем, хитозаном и соответствующей оксикоричной кислотой, сравнение конъюгатов друг с другом не проводилось. Разные буквы латинского алфавита свидетельствуют о наличии достоверной разницы между вариантами,  $p < 0,05$ .

N o t e s: the conjugates were compared with the control, chitosan and the corresponding hydroxycinnamic acid, the conjugates and hydroxycinnamic acids were not compared with each other. Different letters mean that are statistically significantly different at 5 % level of significance.

Известно, что хитозан, являясь элиситором, способен индуцировать у растений стресс разной степени выраженности, при этом в клетках запускаются метаболические реакции защиты, включающие образование активных форм кислорода, которые, в свою очередь, активизируют процессы перекисного окисления липидов [2]. В настоящей работе при добавлении хитозана в питательную среду не выявлено различий в накоплении перекиси водорода в растительной ткани по сравнению с контролем, однако показано существенное накопление продуктов перекисного окисления липидов – малонового диальдегида. Вероятно, вследствие защитной реакции растений на вызванный хитозаном оксидативный стресс, уровень накопления пролина в тканях растений

существенно увеличился, так как известна способность пролина ограничивать неферментативные свободнорадикальные процессы [14].

Присутствие оксикоричных кислот в среде культивирования значительно снизило содержание перекиси водорода в тканях растений. Конъюгаты хитозана с оксикоричными кислотами вызвали несколько разнонаправленное действие. Так, Хит-КК значительно увеличивал содержание пероксида водорода по сравнению с контролем и другими опытными вариантами, а активность Хит-ФК оставалась на уровне феруловой кислоты.

Кроме того, оксикоричные кислоты и их конъюгаты с хитозаном хотя и способствовали снижению накопления продуктов ПОЛ по сравнению с хитозаном, однако количество МДА в этих вариантах значительно превышало его содержание в контрольных растениях.

В исследованиях различных авторов показано, что оксикоричные кислоты проявляют антиоксидантные свойства, снижая образование активных форм кислорода или нейтрализуя свободные радикалы за счет способности окисляться [15]. В модельных тестовых экспериментах установлено, что и конъюгаты хитозана с фенольными соединениями также обладают антиоксидантными свойствами [3]. Напротив, в других работах выявлено, что в растительной клетке простые фенольные кислоты ингибируют активность антиоксидантных ферментов, способствуя тем самым образованию активных форм кислорода и ускорению процессов перекисного окисления липидов [10].

**Заключение.** Таким образом, показано, что значительный эффект по стимуляции роста и развития микроклонов картофеля достигается при добавлении в среду культивирования кофейной кислоты и ее конъюгата на основе хитозана. Конъюгат Хит-КК в большей степени действует на развитие надземной части микроклональных растений, при этом значительно увеличивая содержание пероксида водорода и МДА по сравнению с контролем, а также накопление пролина в корнях по сравнению с кофейной кислотой и контролем. Вероятно, конъюгат хитозана и кофейной кислоты проявляет себя как слабый стрессор, который приводит к активизации метаболизма и адаптационных процессов у растений. При добавлении хитозана в питательную среду обнаружено развитие оксидативного стресса в растительных клетках, на что указывает существенное накопление продуктов перекисного окисления липидов и высокое содержание пролина в тканях растений. Оксикоричные кислоты проявили антиоксидантные свойства, снижая образование активных форм кислорода, а также стресс-индуцированное накопление пролина.

#### Список использованных источников

1. The Multifunctional Role of Chitosan in Horticultural Crops; A Review / R. Sharif [et al.] // *Molecules*. – 2018. – Vol. 23, N 4. – Art. 872. <https://doi.org/10.3390/molecules23040872>
2. Chitosan in plant protection / A. El Hadrami [et al.] // *Marine Drugs*. – 2010. – Vol. 8, N 4. – P. 968–987. <https://doi.org/10.3390/md8040968>
3. Хитин/хитозан и его производные: фундаментальные и прикладные аспекты / В. П. Варламов [и др.] // *Успехи биологической химии*. – 2020. – Т. 60. – С. 317–368.
4. Lichtenthaler, H. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents / H. Lichtenthaler, A. Wellburn // *Biochemical Society Transactions*. – 1983. – Vol. 11, N 5. – P. 591–592. <https://doi.org/10.1042/bst0110591>
5. Андрианова, Ю. Е. Хлорофилл и продуктивность растений / Ю. Е. Андрианова, И. А. Тарчевский. – М., 2000. – 135 с.
6. Extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced by Oligagalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated *roIB* gene expression in tobacco leaf explants / D. Bellincampi [et al.] // *Plant Physiology*. – 2000. – Vol. 122, N 4. – P. 1379–1386. <https://doi.org/10.1104/pp.122.4.1379>
7. Copper-induced damage to the permeability barrier in roots of *Silene cucuhalus* / C. H. R. De Vos [et al.] // *J. Plant Physiology*. – 1989. – Vol. 135, N 2. – P. 164–169. [https://doi.org/10.1016/s0176-1617\(89\)80171-3](https://doi.org/10.1016/s0176-1617(89)80171-3)
8. Bates, L. S. Rapid determination of free proline for water-stress studies / L. S. Bates, R. P. Waldren, J. D. Teare // *Plant and Soil*. – 1973. – Vol. 39, N 1. – P. 205–207. <https://doi.org/10.1007/bf00018060>
9. Параметры роста и антиоксидантная активность в проростках огурца при применении конъюгатов хитозана с оксикоричными кислотами в условиях солевого стресса / Е. Л. Недведь [и др.] // *Прикл. биохимия и микробиология*. – 2022. – Т. 58, № 1. – С. 74–82.

10. Biosynthesis and metabolic actions of simple phenolic acids in plants / R. Marchiosi [et al.] // *Phytochemistry Reviews*. – 2020. – Vol. 19, N 4. – P. 865–906. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09689-2>
11. Lee, Y. S. Changes in the respiration, growth and vitamin C content of Soybean sprouts in response to chitosan of different molecular weights / Y. S. Lee, Y. H. Kim, S. B. Kim // *HortScience*. – 2005. – Vol. 40, N 5. – P. 1333–1335. <https://doi.org/10.21273/hortsci.40.5.1333>
12. Biological effect of irradiated chitosan on plants in vitro / V. T. T. Ha [et al.] // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. – 2005. – Vol. 41, N 1. – P. 49–57. <https://doi.org/10.1042/ba20030219>
13. Chitosan-hydroxycinnamic acid conjugates: synthesis, photostability and phytotoxicity to seed germination of barley / V. Nikalaichuk [et al.] // *J. Applied Polymer Science*. – 2021. – Vol. 139, N 14. – Art. 51884. <https://doi.org/10.1002/app.51884>
14. Proline mechanisms of stress survival / X. Liang [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* – 2013. – Vol. 19, N 9. – P. 998–1011. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5074>
15. Antioxidant profile of dihydroxy- and trihydroxyphenolic acids – A structure-activity relationship study / C. Siquet [et al.] // *Free Radical Research*. – 2006. – Vol. 40, N 4. – P. 433–442. <https://doi.org/10.1080/10715760500540442>

## References

1. Sharif R., Mujtaba M., Rahman M. U., Shalmani A., Ahmad H., Anwar T., Tianchan D., Wang X. The Multifunctional Role of Chitosan in Horticultural Crops; A Review. *Molecules*, 2018, vol. 23, no. 4, art. 872. <https://doi.org/10.3390/molecules23040872>
2. El Hadrami A., Adam L. R., El Hadrami I., Daayf F. Chitosan in Plant Protection. *Marine Drugs*, 2010, vol. 8, no. 4, pp. 968–987. <https://doi.org/10.3390/md8040968>
3. Varlamov V. P., Il'ina A. V., Shagdarova B. C., Lun'cov A. P., Mysyakina I. S. Chitin/chitosan and its derivatives: fundamental and applied aspects. *Uspekhi Biologicheskoi Khimii* [Advances in Biological Chemistry], 2020, vol. 60, pp. 317–368 (in Russian).
4. Lichtenthaler H., Wellburn A. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 1983, vol. 11, no. 5, pp. 591–592. <https://doi.org/10.1042/bst0110591>
5. Andrianova Yu. E., Tarchevskii I. A. *Chlorophyll and plant productivity*. Moscow, 2000. 135 p. (in Russian).
6. Bellincampi D., Dipierro N., Salvi G., Cervone F., De Lorenzo G. Extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced by Oligagalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated *roIB* gene expression in tobacco leaf explants. *Plant Physiology*, 2000, vol. 122, no. 4, pp. 1379–1386. <https://doi.org/10.1104/pp.122.4.1379>
7. De Vos C. H. R., Schat H., Vooijs R., Ernst W. H. O. Copper-induced damage to the permeability barrier in roots of *Silene cucubalus*. *Journal of Plant Physiology*, 1989, vol. 135, no. 2, pp. 164–169. [https://doi.org/10.1016/s0176-1617\(89\)80171-3](https://doi.org/10.1016/s0176-1617(89)80171-3)
8. Bates L. S., Waldren R. P., Teare I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 1973, vol. 39, no. 1, pp. 205–207. <https://doi.org/10.1007/bf00018060>
9. Nedved E. L., Kalatskaja J. N., Ovchinnikov I. A., Rybinskaya E. I., Laman N. A., Kraskouski A. N., Nikalaichuk V. V., Hileuskaya K. S., Kulikouskaya V. I., Agabekov V. E. Growth parameters and antioxidant activity in cucumber seedlings with the application of chitosan and hydroxycinnamic acids conjugates under salt stress. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2022, vol. 58, no. 1, pp. 69–76. <https://doi.org/10.1134/s0003683822010069>
10. Marchiosi R., dos Santos W. D., Constantin R. P., de Lima R. B., Soares A. R., Finger-Teixeira A., Mota T. R., de Oliveira D. M., de Paiva Foletto-Felipe M., Abrahão J., Ferrarese-Filho O. Biosynthesis and metabolic actions of simple phenolic acids in plants. *Phytochemistry Reviews*, 2020, vol. 19, no. 4, pp. 865–906. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09689-2>
11. Lee Y. S., Kim Y. H., Kim S. B. Changes in the respiration, growth and vitamin C content of Soybean sprouts in response to chitosan of different molecular weights. *HortScience*, 2005, vol. 40, no. 5, pp. 1333–1335. <https://doi.org/10.21273/hortsci.40.5.1333>
12. Ha V. T. T., Luan L. Q., Nagasawa N., Kume T., Yoshii F., Nakanishi T. M. Biological effect of irradiated chitosan on plants in vitro. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2005, vol. 41, no. 1, pp. 49–57. <https://doi.org/10.1042/ba20030219>
13. Nikalaichuk V., Hileuskaya K., Kraskouski A., Kulikouskaya V., Nedved H., Kalatskaja J., Rybinskaya E., Herasimovich K., Laman N., Agabekov V. Chitosan-hydroxycinnamic acid conjugates: synthesis, photostability and phytotoxicity to seed germination of barley. *Journal of Applied Polymer Science*, 2022, vol. 139, no. 14, art. 51884. <https://doi.org/10.1002/app.51884>
14. Liang X., Zhang L., Natarajan S. K., Becker D. F. Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2013, vol. 19, no. 9, pp. 998–1011. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5074>
15. Siquet C., Paiva-Martins F., Lima J. L. F. C., Reis S., Borges F. Antioxidant profile of dihydroxy- and trihydroxyphenolic acids – A structure-activity relationship study. *Free Radical Research*, 2006, vol. 40, no. 4, pp. 433–442. <https://doi.org/10.1080/10715760500540442>

**Информация об авторах**

*Еловская Нинель Анатольевна* – аспирант. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: yalousskaya92@mail.ru.

*Калацкая Жанна Николаевна* – канд. биол. наук, доцент. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kalatskayaj@mail.ru.

*Ламан Николай Афанасьевич* – академик, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: nikolai.laman@gmail.com.

*Гилевская Ксения Сергеевна* – канд. хим. наук, доцент, ст. науч. сотрудник. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: k\_hilevskay@mail.ru.

*Куликовская Виктория Игоревна* – канд. хим. наук, заведующий лабораторией. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kulikousskaya@gmail.com.

*Николайчук Виктория Викторовна* – магистрант, мл. науч. сотрудник. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vica10bcn@gmail.com.

**Information about the author**

*Yalousskaya Ninel A.* – Postgraduate Student. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yalousskaya92@mail.ru.

*Kalatskaja Joanna N.* – Ph. D. (Biology), Associate Professor. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kalatskayaj@mail.ru.

*Laman Nikolai A.* – Academician, D. Sc. (Biology), Professor, Head of the Laboratory. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nikolai.laman@gmail.com.

*Hileuskaya Kseniya S.* – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Senior Researcher. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skorina Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: k\_hilevskay@mail.ru.

*Kulikousskaya Viktoriya I.* – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skorina Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kulikousskaya@gmail.com.

*Nikolaichuk Viktoriya V.* – Master Student, Junior Researcher. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skorina Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vica10bcn@gmail.com.