



УДК 581.1

**УГЛЕВОДЫ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА РОСТ И  
НАКОПЛЕНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЕ  
ЧАЙНОГО РАСТЕНИЯ (*CAMELLIA SINENSIS* L.)****CARBOHYDRATES IN THE CULTURE MEDIUM AND THEIR INFLUENCE ON  
GROWTH AND ACCUMULATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN TEA PLANT  
CALLUS CULTURE (*CAMELLIA SINENSIS* L.)****Н.В. Загоскина, Т.Л. Нечаева, Т.Н. Николаева, П.В. Лапшин, Е.А. Гончарук  
N.V. Zagoskina, T.L. Nechayeva, T.N. Nikolaeva, P.V. Lapshin, E.A. Goncharuk**

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Россия, 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, 35  
Institute of Plant Physiology named after K.A. Timiryazev, Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya St, Moscow,  
127276, Russia

E-mail: biophenol@gmail.com

**Аннотация.** Исследовано влияние двух концентраций глюкозы и сахарозы (2.5% и 1.5%) на рост, содержание сахаров и фенольных соединений, а также активность *L*-фенилаланинаммиак-лиазы (ФАЛ) в каллусной культуре чайного растения (*Camellia sinensis* L.). При изменении их концентрации в среде отмечено повышение прироста их биомассы (в большей степени при 1.5%). Во всех опытных вариантах (2.5% и 1.5% сахарозы, 1.5% глюкозы) суммарное содержание сахаров в каллусах было на 30–40% ниже, чем в контроле (2.5% глюкозы). Что касается накопления фенольных соединений, включая и характерные для чая флаваны – вещества с *P*-витаминной капилляро-укрепляющей активностью, то оно повышалось на 50–70% по отношению к контрольному варианту. Для активности ФАЛ в определенной степени прослеживалась аналогичная тенденция. Полученные данные свидетельствуют о том, что изменяя состав и концентрацию углеводных компонентов питательной среды можно повысить количество биологически активных соединений, в частности полифенолов, в *in vitro* культивируемых клетках чайного растений.

**Résumé.** Tea plant callus cultures (*Camellia sinensis* L.) were grown on nutrient media with glucose or sucrose (2.5% and 1.5%). Were analyzed callus growth, the content of sugars and phenolic compounds, as well as the activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL). Modifying carbohydrate concentration in the medium (to a greater extent when it decreases) increased growth activity. All experimental variants (2.5% and 1.5% sucrose, 1.5% glucose), the total content of sugars in the callus tissue was 30–40% lower than in the control variant (2.5% glucose). Callus tissue experimental variants (2.5% and 1.5% sucrose, 1.5% glucose) contained 30–40% less sugar than in the control variant (2.5% glucose). The trend of accumulation of phenolic compounds, including the characteristic of the tea plant flavans – substances with *P*-vitamin capillary-strengthening activity, was the opposite. Changes in the composition and the content of carbohydrates increased amount of phenolic compounds by 50–70% relative to control (2.5% glucose). For PAL activity to a certain degree a similar trend was traced. Therefore, changing the composition and concentration of the carbohydrate component of the nutrient medium can increase the amount of biologically active compounds, in particular polyphenols in tea plant cells.

**Ключевые слова:** *Camellia sinensis* L., каллус, углеводы, рост, фенольные соединения, *L*-фенилаланинаммиак-лиаза.

**Key words:** *Camellia sinensis* L., callus, carbohydrates, growth, phenolic compounds, phenylalanine ammonia-lyase.

**Введение**

Выращивание изолированных клеток и тканей высших растений в условиях *in vitro* (на искусственно созданных питательных средах, в стерильных условиях) позволяет решать не только фундаментальные вопросы биологии клеток, но и получать ценные биологически активные растительные метаболиты, что имеет важное практическое значение [Matkowski, 2008; Nosov, 2010]. К их числу относятся фенольные соединения или полифенолы – одни из наиболее распространенных соединений вторичного метаболизма, присутствующие во всех растительных клетках



[Запрометов, 1993]. Этим веществам свойственна чрезвычайная широта функций – от разобщающего действия в электрон-транспортных цепях фотосинтеза и дыхания до участия в защите клеток от стрессовых воздействий [Bidel et al., 2010].

В настоящее время полифенолы являются объектом пристального внимания исследователей, что в значительной степени обусловлено их биологической и антиоксидантной активностью [Меньщикова и др., 2012]. Они успешно используются при лечении заболеваний сердечно-сосудистой системы, пищеварительного тракта и онкологических заболеваний [Тюкавкина, 2002; Тараховский и др., 2013].

Не вызывает сомнений тот факт, что альтернативными источниками биологических активных соединений, включая и полифенолы, могут быть выращиваемые в условиях *in vitro* клетки и ткани высших растений [Nosov, 2010; Marchev et al., 2014]. Они позволяют получать «экологически чистые» продукты и даже в более высоких концентрациях, что может быть достигнуто за счет изменения состава питательных сред и условий их культивирования (свет, температура и др.) [Бутенко, 1999; Matkowski, 2008; Smith, 2013]. И в этом случае важная роль отводится углеводам. Известно их влияние на рост клеток и тканей, продуктивность, регуляцию экспрессии генов [Calamar, Klerk, 2002; Rolland et al., 2006; Vaque et al., 2012]. Кроме того, сахароза и глюкоза, которые наиболее часто входят в состав питательных сред для выращивания каллусных и суспензионных культур высших растений, могут действовать как сигнальные молекулы для ряда метаболических путей [Koch, 2004]. Это касается и биосинтеза фенольных соединений [Solfanelli et al., 2006; Dai et al., 2014].

Одним из перспективных объектов для изучения накопления фенольных соединений являются растения чая (*Camellia sinensis* L.), характеризующиеся специализированным обменом, направленным на синтез соединений дифенилпропановой структуры [Запрометов, 1964; Ashihara et al., 2010]. Интерес к этой культуре проявляют ботаники, физиологи растений, биохимики, фармакологи и селекционеры [Дараселия и др., 1989; Загоскина и др., 1994; Nagar, Sood, 2006; Притула и др., 2011]. В значительной степени он обусловлен ее широким использованием в пищевом рационе человека получаемого из него продукта – чая. Его свойства и биологическая активность связаны с высоким содержанием фенольных соединений, в том числе флаванов – веществ с *P*-витаминной капилляроукрепляющей активностью [Запрометов, 1964; Барабой, 2008]. Следует также отметить антиоксидантную активность экстрактов из растений чая, что привело к появлению большого спектра фармакологических и косметических препаратов, разнообразных биологических добавок на его основе [Яшин, Яшин, 2010; Тараховский и др., 2013].

Ранее было установлено, что в условиях *in vitro* культуры чая сохраняли способность к образованию фенольных соединений, в том числе и характерных для него флаванов [Корецкая, Запрометов, 1975]. Однако их содержание было ниже, чем в тканях интактных растениях, а состав – менее разнообразен [Запрометов и др., 1979]. Возможно, это обусловлено изменениями в биосинтезе фенольных соединений, в том числе активности ферментов, участвующих в их образовании [Saito et al., 2013]. И в этом случае важная роль принадлежит *L*-фенилаланинаммиак-лиазе (ФАЛ), осуществляющей процесс дезаминирования *L*-фенилаланина с образованием *транс*-коричной кислоты, которая является предшественником разнообразных фенольных соединений, включая фенилпропаноиды, флаваоноиды и фенольный полимер лигнин [Запрометов, 1993; Cheunier et al., 2013].

Инновационные биотехнологии требуют получения культур с высоким содержанием биологически активных веществ, что может быть достигнуто варьированием концентрации и состава углеводов в питательных средах, а также световыми условиями [Zaprometov, 1989; Cai et al., 2012]. Такой подход делает возможным не только увеличение накопления полифенолов в каллусных и суспензионных культурах, но и изменение их состава.

Целью исследования являлось сравнение действия различных концентраций глюкозы и сахарозы (основных углеводных компонентов питательных сред для



культур *in vitro*) на рост, содержание сахаров и фенольных соединений, включая флаваны, а также активность ФАЛ в каллусной культуре чайного растения. Такой подход позволит выяснить влияние этих углеводов на накопление первичных метаболитов клеток растений (сахаров) и биосинтез вторичных метаболитов (полифенолов), что послужит основой изучения механизмов регуляции накопления биологически-активных веществ в условиях *in vitro*.

### Объекты и методы исследования

Объектом исследования являлась каллусная культура стебля чайного растения (*Camellia sinensis* L., грузинская разновидность, штамм ЧС-2), выращиваемая на основной питательной среде Хеллера с 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (5 мг/л) и глюкозой (2.5%) [Корецкая, Запрометов, 1975]. В опытных вариантах углеводы питательной среды были представлены не только глюкозой, но и сахарозой, содержание которых составляло 1.5% или 2.5%. Культуры в течение одного пассажа выращивали при +24°C в условиях 16-час. фотопериода (интенсивность освещения 5000 люкс). В конце пассажа (42 дня) каллусные ткани взвешивали, замораживали жидким азотом и хранили при -70°C для биохимических исследований.

Определяли прирост каллусной ткани, учитывая массу каллусов в конце пассажа. Повторность в вариантах 10-кратная.

Для определения содержания сахаров замороженный материал подвергали экстракции 70%-ным этанолом [Олениченко и др., 2008]. Экстракты центрифугировали (13000 g, 10 мин.) и в надсадочной жидкости спектрофотометрическим методом определяли суммарное содержание сахаров по реакции с фенолом и серной кислотой (поглощение при 490 нм) [Dubois et al., 1956]. Калибровочную кривую строили по сахарозе.

Фенольные соединения извлекали из растительного материала 96%-ным этанолом при 45°C [Олениченко, Загоскина, 2005]. Этанольные экстракты центрифугировали (13000 g, 10 мин.) и надсадочную жидкость использовали для спектрофотометрического определения содержания фенольных соединений (реактив Фолина-Дениса, поглощение при 725 нм) и флаванов (ванилиновый реактив, поглощение при 500 нм) [Запрометов, 1971]. Калибровочные кривые в обоих случаях строили по (-)-эпикатехину.

Для определения активности ФАЛ замороженный в азоте материал гомогенизировали на холоду в 0.1 М Na-боратном буфере (pH 8.8), содержащем 0.5 мМ ЭДТА и 3 мМ дитиотреитола, с добавлением водонерастворимого поливинилпирролидона (Поликлар АТ, 25% от веса сырой ткани) [Олениченко, Загоскина, 2005]. Гомогенат фильтровали, центрифугировали (25000 g, 20 мин.) и надсадочную фракцию использовали в качестве «грубого» ферментного препарата для определения активности фермента. Все операции проводили на холоду (+4°C).

Активность ФАЛ определяли спектрофотометрически по образованию продукта реакции *транс*-коричной кислоты из *L*-фенилаланина по поглощению при 290 нм в смеси, содержащей 0.1 М Na-боратный буфер (pH 8.8), 0.01 М *L*-фенилаланина и «грубый» ферментный препарат (60 мкг белка/мл) в общем объеме 2 мл [Zucker, 1965]. Активность ФАЛ выражали в нмоль *транс*-коричной кислоты/мг белка×час.

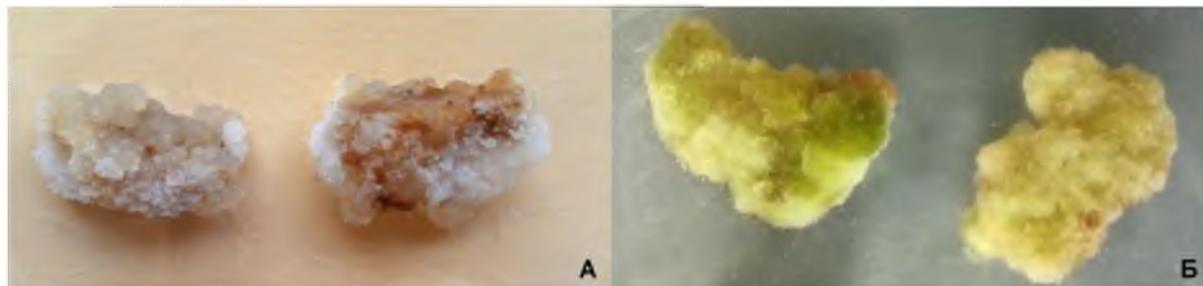
Количество белка в экстрактах определяли по методу Бредфорда (Bradford, 1976).

Анализы проводили в двух биологических и трех аналитических повторностях. Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием программы Statistica 6.0. На рисунках представлены средние арифметические значения определений и их стандартные отклонения.

### Результаты и их обсуждение

Каллусная культура чайного растения, выращиваемая в темноте, представляла собой плотный каллус светло-бежевого цвета (рис. 1). При перенесении в условия 16-час. фотопериода она приобретала яркую желтую окраску и на ее поверхности

формировались клеточные агрегаты светло-зеленого цвета. Возможно это обусловлено начальными этапами формирования хлоропластов, что происходит при деэтиоляции растительных тканей [Waters, Langdale, 2009]. В целом, «позеленение» каллусов было более выражено на средах с 1.5% углеводов. Это согласуется с имеющимися в литературе данными о том, что высокий уровень этих компонентов питательной среды препятствует формированию хлоропластов и становлению их фотосинтетической функции [Смолов и др., 1975].

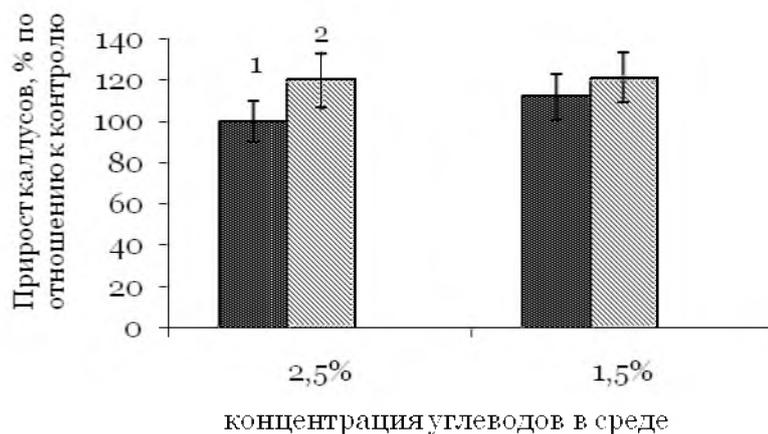


*Рис. 1.* Каллусная культура чайного растения, выращиваемая в темноте (А) или в условиях 16-часового фотопериода (Б, первый пассаж) на среде с 2.5% глюкозы.

Возраст культур – 40 дней

*Fig. 1.* Tea plant callus culture is grown in the dark (A) or in 16-hour photoperiod (Б, one passage) on the medium with 2.5% glucose. Cultures age – 40 days.

Ранее проведенные исследования показали, что наиболее оптимальной для роста и накопления полифенолов в гетеротрофных каллусных культурах чая являлась глюкоза, концентрация которой в среде составляла 2.5% [Корецкая, Запрометов, 1975]. Именно этот вариант использовался в качестве контроля. Как следует из полученных нами данных, замена глюкозы на сахарозу (в той же концентрации) способствовала лучшему росту каллусов: в опытном варианте их прирост был на 20% выше по сравнению с контролем (рис. 2).



*Рис. 2.* Прирост сырой массы каллусной культуры чайного растения, выращиваемой на средах с различной концентрацией (2.5% и 1.5%) глюкозы (1) или сахарозы (2).

Возраст культур – 40 дней

*Fig. 2.* Increase in raw weight of the tea plant callus culture grown on nutrient media containing different concentrations (2.5% and 1.5%) glucose (1) or sucrose (2).

The age of cultures – 40 days

Аналогичная тенденция, хотя и выраженная в значительно меньшей степени, отмечалась и при более низкой концентрации этих углеводов в среде (1.5%). Исходя из

этих данных, можно заключить, что при одинаковой концентрации углеводов в среде (2.5% или 1.5%) сахароза способствовала лучшему росту культур чая, чем глюкоза. О преимущественном использовании этого дисахарида в качестве компонента питательной среды для роста культур клеток и тканей сообщалось многими исследователями [Бутенко, 1999; Naik, 2010]. И еще один интересный факт - при более низком уровне глюкозы в среде прирост каллусной массы повышался, а в присутствии сахарозы этого не наблюдалось. Можно даже говорить о том, что концентрация сахарозы в исследованном нами диапазоне (1.5–2.5%) не влияла на рост каллусов чая. Таким образом, состав и количество углеводов в питательной среде влияют на рост каллусных культур чая, что согласуется и с данными других исследователей [Бутенко, 1999; Marthy et al., 2014].

Следующей нашей задачей являлось изучение суммарного содержания сахаров в каллусных культурах чая, которые необходимы для их роста и метаболизма. Как следует из полученных данных, на среде с 2.5% глюкозы, которая являлась основной при их культивировании, оно было самым высоким по сравнению со всеми другими вариантами (рис. 3).

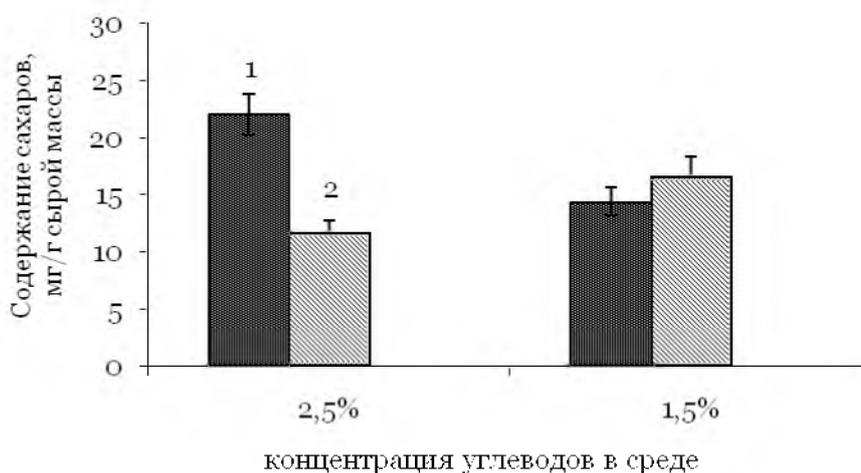


Рис. 3. Содержание сахаров в каллусных культурах чайного растения, выращиваемых на средах с различной концентрацией (2.5% и 1.5%) глюкозы (1) или сахарозы (2).

Возраст культур – 40 дней

Fig. 3. The sugar content of the tea plant callus cultures grown on nutrient media containing different concentrations (2.5% and 1.5%) of glucose (1) or sucrose (2).

The age of cultures – 40 days

На среде с 2.5% сахарозы содержание сахаров было почти вдвое ниже, что может быть следствием либо низкой скорости ее поступления в каллусные культуры, по сравнению с глюкозой, либо высокой скоростью метаболизации. Последнее более вероятно, поскольку в этом случае отмечался хороший прирост каллусной массы (см. рис. 2). Это согласуется и данными литературы, где сообщалось об увеличении размеров растений при экзогенном действии сахарозы [Tognetti et al., 2013]. Что касается культур, растущих на средах с 1.5% углеводов, то содержание в них сахаров было практически одинаковым. При этом оно было на 35–40% ниже, чем на среде с 2.5% глюкозы, и достаточно близким к таковому на среде с 2.5% сахарозы. Полученные данные свидетельствуют о наличии взаимосвязи между ростом каллусных культур чая и суммарным содержанием в них сахаров: чем выше был прирост каллусной массы, тем меньше в них накапливалось этих первичных метаболитов. Можно также говорить о том, что содержание сахаров в культивируемых *in vitro* клетках чайного растения определяется преимущественно общим уровнем углеводов в питательной среде и, крайне мало их структурой (глюкоза – моносахарид,

сахароза – дисахарид). Возможно, это связано с более простым уровнем их дифференциации, значительно отличающимся от такового интактных растений, у которых выявлены значительные различия в действии этих углеводов на процессы роста и развития [Tognetti et al., 2013].

Как уже отмечалось выше, одной из характерных особенностей чайного растения, а также инициированных из него каллусных культур является способность к образованию различных фенольных соединений, которые представлены флаванами и фенилпропаноидами [Запрометов, 1964; Загоскина и др., 1997]. Определение суммарного содержания полифенолов, как важного показателя биосинтетической активности растительных тканей [Запрометов, 1971], показало, что наиболее низкий их уровень был на среде с 2.5% глюкозы (рис. 4). Внесение в среду сахарозы вместо глюкозы (в той же концентрации) почти на 40% повышало их содержание в каллусах. Более высокая способность к накоплению этих веществ наблюдалась и в вариантах с 1.5% углеводов, особенно в присутствии глюкозы.

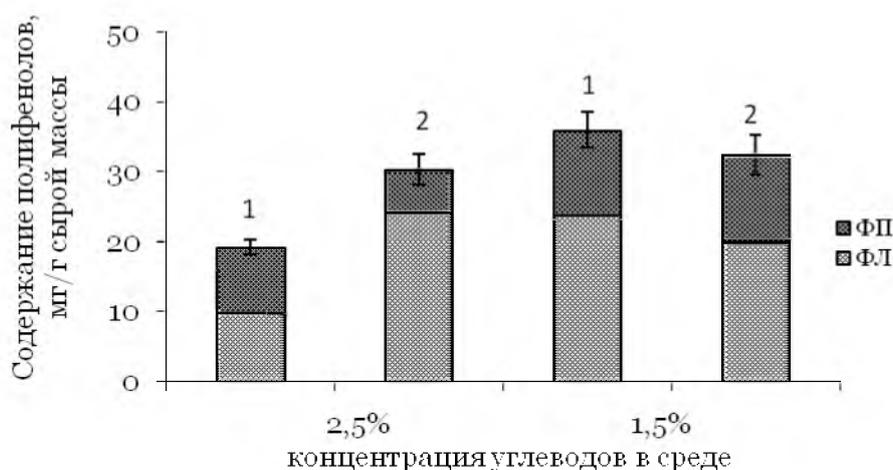


Рис. 4. Суммарное содержание фенольных соединений в каллусных культурах чайного растения, выращиваемых на средах с различной концентрацией (2.5% и 1.5%) глюкозы (1) или сахарозы (2): ФЛ – флаванов, ФП – фенилпропаноиды.

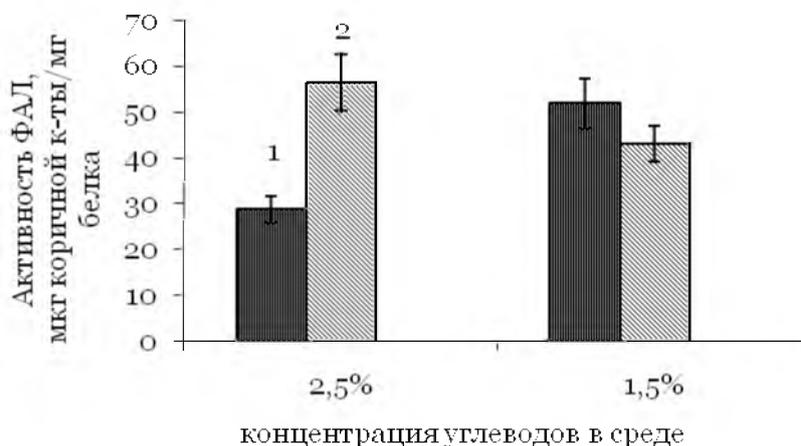
Возраст культур – 40 дней

Fig. 4. The total content of phenolic compounds in the tea plant callus cultures grown on nutrient media containing various concentrations (2.5% and 1.5%) of glucose (1) or sucrose (2). The age of cultures – 40 days

Определение содержания флаванов, основных компонентов фенольного комплекса чая, показало влияние углеводов питательной среды на их накопление в каллусных культурах (рис. 4). При этом, на средах, содержащих 2.5% углеводов, отмечен как один из самых низких (глюкоза), так и самых высоких (сахароза) их показателей. Что касается более низкой их концентрации (1.5%), то в этом случае наибольшее количество флаванов было в культуре, растущей на среде с глюкозой, тогда как на среде с сахарозой оно было ниже (на 20%). Следует также подчеркнуть наличие обратной корреляции между содержанием сахаров (см. рис. 3) и накоплением полифенолов (см. рис. 4) в каллусных тканях чая. Наиболее ярко эта тенденция прослеживалась в варианте с действием 2.5% сахарозы. Все это свидетельствует о регуляции фенольного метаболизма в культивируемых *in vitro* клетках чая путем изменения состава и содержания углеводов питательной среды, что согласуется с данными других авторов [Vaquer et al., 2012; Dai et al., 2014].

Известно, что углеводы являются необходимыми субстратами для биосинтеза различных классов фенольных соединений [Запрометов, 1971]. Так, при поступлении глюкозы или сахарозы накопление этих вторичных метаболитов (антоцианов, антрохинонов и других соединений) в клетках растений повышалось [Vaquer et al.,

2012; Dai et al., 2014]. Это сопровождалось индукцией генов фенольного метаболизма [Solfanelli et al., 2006]. Поскольку ФАЛ является так называемым «ключевым» ферментом в биосинтезе фенольных соединений приводящим к образованию предшественника подавляющего большинства соединений фенольной природы, то следующей нашей задачей являлось определение ее активности в каллусных культурах (рис. 5).



**Рис. 5.** Активность *L*-фенилаланинаммиак-лиазы в каллусных культурах чайного растения, выращиваемых на средах с различной концентрацией (2.5% и 1.5%) глюкозы (1) или сахарозы (2). Возраст культур – 40 дней

**Fig. 5.** Activity of *L*-phenylalanine ammonia-lyase in tea plant callus cultures grown on nutrient media containing various concentrations (2.5% and 1.5%) of glucose (1) or sucrose (2).

The age of cultures – 40 days

Наиболее низкий показатель был в каллусах, растущих на среде 2.5% глюкозы. Во всех остальных вариантах удельная активность ФАЛ была значительно выше. Наибольшие показатели отмечены в каллусах, растущих на среде с 2.5% сахарозы (в 2 раза выше, чем на среде с 2.5%). На средах с 1.5% углеводов ее уровень также был высок, особенно на среде с глюкозой. Все это свидетельствует о том, что изменение содержания и состава углеводов в питательной среде способствовало повышению активности ФАЛ в каллусных культурах чая и, как следствие, сопровождалось накоплением в них фенольных соединений. Следует также подчеркнуть, что во всех случаях изменения в активности фермента были выражены в значительно большей степени (в 2 и более раз), чем в содержании этих вторичных метаболитов (50–70%). Имеющиеся в литературе данные о взаимосвязи между активностью ФАЛ и накоплением полифенолов в растительных тканях также далеко не однозначны. Так, в ряде случаев обнаружена прямая корреляция между ними, тогда как в других – ее не отмечалось [Сергейчик, 1987; Олениченко, Загоскина, 2005; Klejdus et al., 2013].

### Заключение

На основании полученных данных можно заключить, что изменяя состав углеводных компонентов питательной среды и их концентрацию можно вызвать изменения в характере роста и накопления фенольных соединений, в том числе и флаванов – веществ с *P*-витаминной капилляро-укрепляющей активностью, в культивируемых *in vitro* клетках чайного растения. Если основным критерием их продуктивности считать содержание биологически-активных веществ фенольной природы, то выращивание культур на средах с 1.5% углеводов являлось оптимальным для этого процесса, особенно в случае глюкозы. Кроме того, каллусные культуры чая можно рассматривать в качестве потенциальных «продуцентов» фенольных



соединений, в том числе и флаванов, которым в последнее время уделяется большое внимание исследователей и практиков [Punyasiri et al., 2004; Luximon-Ramma et al., 2006; Тараховский и др., 2013].

В заключении следует еще раз подчеркнуть важную роль концентрации и состава углеводов для роста клеточных культур растений и накопления в них различных метаболитов, в том числе полифенолов – соединений с высокой биологической и антиоксидантной активностью.

#### Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 14-04-01742).

#### Список литературы References

1. Барабой В. А. 2008. Катехины чайного растения: структура, активность, применение. *Биотехнология*, (1): 25–37.  
Baraboi V.A. 2008. Catechins in tea plants: structure, activity, application. *Biotechnology*, (1): 25–37. (in Ukrainian)
2. Бутенко Р.Г. 1999. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. М., ФБК-Пресс, 152.  
Butenko R.G. 1999. *Biologija kletok vysshih rastenij in vitro i biotehnologija na ih osnove* [Biology of cells of higher plants *in vitro* and biotechnology based on them]. Moscow, FBK-Press, 152. (in Russian)
3. Дараселия М.К., Воронцов В.В., Гвасалия В.П., Цанава В.П. 1989. Культура чая в СССР. Тбилиси, Мецниереба, 560.  
Daraselija M.K., Vorontsov V.V., Gvasalija V.P., Tsanova V.P. 1989. *Kultura chaja v SSSR*. [Culture of tea in the USSR]. Tbilisi, Metsniereba, 560. (in Russian)
4. Загоскина Н.В., Фернандо С.Ч., Федосеева В.Г., Азаренкова Н.Д., Запроматов М.Н. 1994. К вопросу о способности диплоидных и полиплоидных сортов чайных растений к образованию фенольных соединений. *Сельскохозяйственная биология*, (1): 117–119.  
Zagoskina N.V., Fernando S.Ch., Fedoseeva V.G., Azarenkova N.D., Zaprometov M.N. 1994. To a question about the ability of diploid and polyploid varieties of tea plants in the formation of phenolic compounds. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya*, (1): 117–119. (in Russian, with English summary)
5. Загоскина Н.В., Федосеева В.Г., Запроматов М.Н. 1997. Уровень плоидности каллусных культур чайного растения и образование фенольных соединений. *Физиология растений*, 44: 931–934.  
Zagoskina N.V., Fedoseeva V.G., Zaprometov M.N. 1997. The level of ploidy in callus cultures of the tea plant and the formation of phenolic compounds. *Russian Journal of Plant Physiology*, 44: 931–934.
6. Запроматов М.Н. 1964. Биохимия катехинов. М., Наука, 290.  
Zaprometov M.N. 1964. *Biohimija katehinov* [Biochemistry of catechins]. Moscow, Nauka, 290. (in Russian)
7. Запроматов М.Н. 1971. Основы биохимии фенольных соединений. М., Высшая школа, 250.  
Zaprometov M.N. 1971. *Osnovy biohimii fenolnyh soedinenij* [Basics of biochemistry phenolic compounds]. Moscow, Vyshaja skola, 250. (in Russian)
8. Запроматов М.Н. 1971. Фенольные соединения и методы их исследования. В кн.: Биохимические методы в физиологии растений. М., Наука: 185–197.  
Zaprometov M.N. 1971. Fenol'nye soedinenija i metody ih issledovanija. *In: Biohimicheskie metody v fiziologii rastenij* [Phenolic compounds and methods of their investigations]. Moscow, Nauka: 185–197. (in Russian)
9. Запроматов М.Н. 1993. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. М., Наука, 272.  
Zaprometov M.N. 1993. Fenol'nye soedinenija: rasprostranenie, metabolism i funkcii v rastenijah [Phenolic compounds: distribution, metabolism and functions in plants]. Moscow, Nauka, 272. (in Russian)



10. Запрометов М.Н., Загоскина Н.В., Стрекова В.Ю., Морозова Г.А. 1979. Образование фенольных соединений в процессе дифференциации в каллусной культуре чайного растения. *Физиология растений*, 26: 485–491.

Zaprometov M.N., Zagoskina N.V., Strekova V.Ju., Morozova G.A. 1979. Formation of phenolic compounds in the course of differentiation in callus culture of the tea plant. *Russian Journal of Plant Physiology*, 26: 485–491. (in Russian)

11. Корецкая Т.Ф., Запрометов М.Н. 1975. Культура ткани чайного растения (*Camellia sinensis*) как модель для изучения условий образования фенольных соединений. *Физиология растений*, 22: 282–285.

Koretskaya T.F., Zaprometov M.N. 1975. Culture of the tea plant tissue (*Camellia sinensis*) as a model for the study of conditions of the formation Phenolic Compounds. *Russian Journal of Plant Physiology*, 22: 282–285. (in Russian)

12. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Кандалинцева Н.В. 2012. Фенольные антиоксиданты в биологии и медицине. Строение, свойства, механизмы действия. Berlin, Lambert Academic Publishing, 488.

Men'schikova E.B., Lankin V.Z., Kandalinceva N.V. 2012. Fenol'nye antioksidanty v biologii i medicine. Stroenie, svojstva, mehanizy dejstvija [Phenolic antioxidants in biology and medicine. Structure, properties, mechanism of action]. Berlin, Lambert Academic Publishing, 488. (in Russian)

13. Олениченко Н.А., Загоскина Н.В. 2005. Ответная реакция озимой пшеницы на действие низких температур: образование фенольных соединений и активность L-фенилаланинаммияк-лиазы. *Прикладная биохимия и микробиология*, 41: 681–685.

Olenichenko N.A., Zagoskina N.V. 2005. Response of winter wheat to cold: production of phenolic compounds and L-phenylalanine ammonia lyase activity. *Applied Biochemistry and Microbiology*: 41, 681–685. (in Russian)

14. Олениченко Н.А., Астахова Н.В., Трунова Т.И., Кузнецов Ю.В., Загоскина Н.В. 2008. Первичный и вторичный метаболизм озимой пшеницы при холодовом закаливании и действии антиоксидантов. *Прикладная биохимия и микробиология*, 44: 523–529.

Olenichenko N.A., Astahova N.V., Trunova T.I., Kuznetsov Ju.V., Zagoskina N.V. 2008. Primary and secondary metabolism of winter wheat during cold hardening and action of antioxidants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44: 523–529. (in Russian)

15. Пritула З.В., Малюкова Л.С., Козлова Н.В. 2011. Влияние минеральных удобрений на биохимические показатели качества чайного листа сорта Колхида в условиях субтропиков России. *Агрехимия*, (3): 33–40.

Pritula Z.V., Maljukova L.S., Kozlova N.V. 2011. Influence of mineral fertilizers on the biochemical parameters the quality of the leaf tea varieties Kolkhida in a subtropical Russia. *Agricultural Chemistry*, (3): 33–40. (in Russian)

16. Сергейчик А.А. 1987. Фенилаланин-аммиак-лиаза и фенилпропаноидный метаболизм. *Физиология и биохимия культурных растений*, 19: 211–220.

Sergeichik A.A. 1987. Phenylalanine ammonia-lyase and phenylpropanoids metabolism. *Physiology and biochemistry of cultivated plants*, 19: 211–220. (in Russian)

17. Смоллов А.П., Игнатъев А.Р., Полевая В.С. 1975. Становление функции фотосинтетического аппарата в культуре *in vitro*. *Физиология растений*, 22: 428–430.

Smolov A.P., Ignatiev A.R., Polevaja V.S. 1975. Becoming the photosynthetic apparatus to functions in *in vitro* culture. *Russian Journal of Plant Physiology*, 22: 428–430. (in Russian)

18. Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдрасилов Б.С., Музафаров Е.Н. 2013. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. М., Пушино, 308.

Tarahovsky Y.S., Kim Yu. A., Abdrasilov B.S., Muzafarov E.N. 2013. Flavonoidy: biohimija, biofizika, medicina [Flavonoids: biochemistry, biophysics, medicine]. Moscow, Pushchino, 308. (in Russian)

19. Тюкавкина Н.А. 2002. Биофлавоноиды. М., Русский врач, 56.

Tyukavkina N.A. 2002. Bioflavonoidy [Bioflavonoids]. Moscow, Russian doctor, 56. (in Russian)

20. Яшин Я. И., Яшин А. Я. 2010. Чай. Химический состав чая и его влияние на здоровье человека. М., ТрансЛит, 159.

Yashin YI, Yashin A. J. 2010. Chay. Himiceskij sostav chaya i ego vlijanie na zdravie cheloveka [Tea. The chemical composition of tea and its impact on human health]. Moscow, TransLit, 159. (in Russian)

21. Ashihara H., Deng W.-W., Mullen W., Crozier A. 2010. Distribution and biosynthesis of flavan-3-ols in *Camellia sinensis* seedlings and expression of genes encoding biosynthetic enzymes. *Phytochemistry*, 71: 559–566.



22. Baque M.A., Elgirban A., Lee E.-J., Paek K.-Y. 2012. Sucrose regulated enhanced induction of anthraquinone, phenolics, flavonoids biosynthesis and activities of antioxidant enzymes in adventitious root suspension cultures of *Morinda citrifolia* (L.). *Acta Physiologia Plantarum*, 34: 405–415.
23. Bidel L.P.R., Coumans M., Baissac Y., Doumas P., Jay-Allemand C. 2010. Biological activity in plant cells. *In: Recent advances in polyphenol research*. Vol. 2. Oxford, United Kingdom: 163–205.
24. Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–252.
25. Cai Z., Kastell A., Mevis I., Knorr D., Smatanska I. 2012. Polysaccharide elicitors enhance anthocyanin and phenolic acid accumulation in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Plant Cell, Tissue and Organ culture*, 108: 401–409.
26. Calamar A., Klerk G.J.D. 2002. Effect of sucrose of adventitious root regeneration in apple. *Plant Cell, Tissue and Organ culture*, 70: 207–212
27. Cheynier V., Comte G., Davis K.M., Lattanzio V., Martens S. 2013. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72: 1–20.
28. Dai Z.W., Meddar M., Renaud C., Merlin I., Hibert G., Delrot S., Gomes E. 2014. Long-term in vitro culture of grape berries and its application to assess the effects of sugar supply on anthocyanin accumulation. *Journal of Experimental Botany*. Doi: 10.1093/jxb/ert489. Available at: <http://jxb.oxfordjournals.org/content/early/2014/01/28/jxb.ert489.full.pdf+html> (accessed 10 November 2016).
29. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350–356.
30. Koch K. 2004. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 235–246.
31. Klejdus B., Kováčik J., Babula P. 2013. PAL inhibitor evokes different responses in two *Hypericum* species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 63: 82–88.
32. Luximon-Ramma A., Neerghen V.S., Baborun T., Crozier A., Zbarsky V., Datla K.P., Dexter D.T., Aruoma O.I. 2006. Assessment of the polyphenolic composition of the organic extracts of Mauritian black teas: a potential contributor to their antioxidant functions. *Biofactors*, 27: 79–91.
33. Marthy H.N., Lee E.-J., Paek K.-Y. 2014. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ culture*, 118: 1–16.
34. Matkowski A. 2008. Plant cell in vitro culture for production of antioxidants. *Biotechnology Advances*, 26: 548–560.
35. Nagar P.K., Sood S. 2006. Changes in endogenous auxins during winter dormancy in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Acta Physiologiae Plantarum*, 28: 165–169.
36. Naik P.M., Manohar S.H., Praveen N., Murty H.N. 2010. Effects of sucrose and pH levels on in vitro shoot regeneration from leaf explants of *Bacopa monnieri* and accumulation of bacoside A in regenerated shoots. *Plant Cell, Tissue and Organ culture*, 100: 235–239.
37. Nosov A.M. 2012. Application of cell technologies for production of plant-derived bioactive substances of plant origin. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48: 609–624.
38. Punyasiri P.A., Abeysinghe I.S., Kumar V., Treutter D., Duy D., Gosch C., Martens S., Forkmann G., Fischer T.C. 2004. Flavonoid biosynthesis in the tea plant *Camellia sinensis*: properties of enzymes of the prominent epicatechin and catechin pathways. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 431: 22–30.
40. Rolland F., Baena-Gonzalez E., Sheen J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual review of plant biology*, 57: 675–709.
41. Saito K., Yonekura-Sakakibara K., Nakabayashi R., Higashi Y., Yamazaki M., Tohge T., Fernie A.R. 2013. The flavonoid biosynthetic pathway in *Arabidopsis*: Structural and genetic diversity. *Plant Physiology and Biochemistry*. Doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.02.001. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23473981> (accessed 10 November 2016).
42. Smith R.H. 2013. Plant tissue culture. Techniques and experiments. Amsterdam, Elsevier, 195.
43. Solfanelli C., Poggi A., Loreti E., Alpi A., Perata P. 2006. Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 140: 637–646.
44. Tognetti J.A., Pontis H.G., Martínez-Noël G.M.A. 2013. Sucrose signaling in plants: A world yet to be explored. *Plant Signaling & Behavior*, 8. Doi.org/10.4161/psb.23316. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/psb.23316> (accessed 10 November 2016).



45. Waters M.T., Langdale J.A. 2009. The making of a chloroplast. *The EMBO Journal*, 28: 2861–2873.
46. Zaprometov M. 1989. The formation of phenolic compounds in plant cell and tissue cultures and the possibility of its regulation. *Advances in Cell Culture*, 7: 201–260.
47. Zucker M. 1969. Sequential induction of phenylalanine ammonia-lyase and lyase-inactivating system in potato tuber disks. *Plant Physiology*, 42: 365–369.