


## КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПРОРОСТКОВ ЛЬНА (*Linum L.*) И ИХ РЕАКЦИЯ НА ДЕЙСТВИЕ ИОНОВ КАДМИЯ В УСЛОВИЯХ *in vitro*: УРОВЕНЬ СТРЕССОВОЙ РЕАКЦИИ И НАКОПЛЕНИЕ ПОЛИФЕНОЛОВ\*

Е.А. ГОНЧАРУК <sup>✉</sup>, Т.Л. НЕЧАЕВА, А.В. КАРТАШОВ, Н.В. ЗАГОСКИНА

В видовом многообразии рода *Linum L.*, представленного более чем 200 видами, единственным культурным является *Linum usitatissimum L.* К наиболее востребованным продуктам возделывания льна относятся льняное волокно высокой прочности, жмых, костра (отходы после трепания льна — одревесневшие части стебля, преимущественно в виде мелкой соломки), а также высокопитательное льняное масло — источник короткоцепочечных полиненасыщенных омега-3 и омега-6 жирных кислот, линоленовой кислоты, витаминов А, В, D и Е, клетчатки и белка. Отмечены также высокие декоративные качества льна в ландшафтном озеленении. На сегодняшний день экологическая обстановка в льносеющих регионах неблагоприятна, в том числе из-за загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами, в частности кадмием (Cd) — высокотоксичным и подвижным в почвенном растворе элементом первого класса опасности. Его праймерное действие ингибирует физиологически важные ростовые процессы, повышает генерацию активных форм кислорода, инициирует процессы окисления белков и липидов. Все это нарушает эффективное функционирование и активность антиоксидантной системы в растениях, в том числе ее неферментативную составляющую, представленную низкомолекулярными антиоксидантами, к числу которых относятся полифенолы. Последние способны взаимодействовать с активными формами кислорода, количество которых повышается при действии Cd. В настоящей работе впервые проведена оценка стрессовой реакции на действие этого представителя тяжелых металлов у *in vitro* проростков трех разновидностей льна как модельной биотехнологической системы, а также изучена их способность к накоплению полифенолов — эффективных биоантиоксидантов и основных компонентов фенольного комплекса. Мы сравнили ответные реакции *in vitro* проростков на действие Cd по их морфофизиологическим характеристикам, уровню перекисного окисления липидов (ПОЛ) и содержанию фенольных соединений, в том числе фенилпропаноидов и флавоноидов. Объектом исследования служили *in vitro* стерильные проростки льна прядильного (лен-долгунец, сорт Ленок), масличного (лен масличный, сорт Санлин) (*Linum usitatissimum L.*), а также декоративного (лен крупноцветковый *Linum grandiflorum Desf.*, сорт Red) назначения. Для их получения проводили последовательную стерилизацию семян, которые затем помещали на содержащие сахарозу (2 %) безгормональные агаризованные питательные среды Мурасиге-Скуга (лен-долгунец и лен масличный) и Гамборга В5 (лен крупноцветковый). При проведении эксперимента 14-суточные проростки льна подвергали экзогенному воздействию 75 мкМ водного раствора нитрата кадмия (опытный вариант) или воды (контрольный вариант) посредством внесения в прикорневую зону. После 7 сут воздействия анализировали морфометрические параметры проростков (длина гипокотила и главного корня) и содержание в них воды. Биохимические определения проводили в растительном материале, зафиксированном жидким азотом. Содержание Cd анализировали методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии. Фенольные соединения извлекали 96 % этанолом и проводили спектрофотометрическое определение содержания суммы фенольных соединений, фенилпропаноидов и флавоноидов. Уровень ПОЛ определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой. Установлено, что *in vitro* проростки трех разновидностей льна различались по физиолого-биохимическим параметрам, что и определяет их ответную реакцию на действие Cd. Уже на ранних этапах онтогенеза в условиях *in vitro* видоспецифичность проявлялась при формировании корневой системы, образовании реакционных продуктов ПОЛ, а также в накоплении фенольных соединений и поглощении тяжелого металла. Самое высокое содержание Cd выявлено у *in vitro* проростков льна-долгунца — более эффективного аккумулятора Cd относительно льна масличного и льна крупноцветкового. Оно превышало этот показатель у льна масличного и льна крупноцветкового соответственно на 20,2 и 23,6 % ( $p \leq 0,05$ ). При этом уровень ПОЛ снижался только у льна масличного и льна крупноцветкового — соответственно на 24,2 и 34,2 % ( $p \leq 0,05$ ) относительно контроля, что свидетельствует об активации их защитных систем в ответ на действие поллютанта. Повышение суммарного содержания фенольных соединений, а также их различных классов (фенилпропаноидов и флавоноидов) в ответ на действие Cd отмечено только у льна масличного (соответственно на 14 %, 70 % и 49 %,  $p \leq 0,05$ ) относительно контроля, что указывает на активацию защитных систем. Все полученные данные демонстрируют различные ответные реакции *in vitro* проростков трех разновидностей льна под влиянием Cd, что

\* Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 122042600086-7).

обусловлено их видоспецифичностью. В этих условиях более выраженный ответ на уровне фенольного метаболизма характерен для льна масличного, у которого способность синтезировать эти вторичные соединения и активировать функции антиоксидантной системы была выше, чем у двух других представителей рода *Linum*.

**Ключевые слова:** *Linum usitatissimum* L., *Linum grandiflorum* Desf., проростки in vitro, кадмий, морфология, перекисное окисление липидов, полифенолы.

К биологически и хозяйственно ценным представителям рода *Linum* L. относится лен обыкновенный (*Linum usitatissimum* L.), характеризующийся большим разнообразием (1, 2). Лен-долгунец широко используется как прядильная культура, лен-кудряш и лен-межеумок — как масличные культуры (*L. usitatissimum*), лен крупноцветковый (*L. grandiflorum* Desf.) — в качестве декоративного растения. Лен-долгунец служит уникальным источником высококачественного длинного волокна для текстильной промышленности, тресты (обработанная льняная солома, используемая для дальнейшего отделения волокна) и костры (отходы после трепания льна — одревесневшие части стебля, преимущественно в виде мелкой соломки), успешно применяемой в качестве субстрата для культур закрытого грунта и адсорбента (3, 4). Лен масличный — продуцент нутрицевтически ценного льняного масла с высоким содержанием альфа-линоленовой кислоты и обогащенного полиненасыщенными омега-3 жирными кислотами (5, 6). Это масло находит применение не только в фармацевтическом и пищевом производстве, но также в лакокрасочной и полимерной промышленности. Лен крупноцветковый успешно используется при озеленении городов благодаря его ярким цветкам и устойчивости к техногенным воздействиям (7, 8).

Одна из проблем нашего времени — загрязнение окружающей среды различными токсикантами. К наиболее токсичным и широко распространенным техногенным поллютантам относится кадмий (Cd) (9, 10). Его накопление в окружающей среде связано с деятельностью предприятий, производящих краски, антисептические вещества, щелочные аккумуляторы (11). Кроме этого, в сельском хозяйстве применение фосфорных удобрений, содержащих Cd в виде примеси, приводит к повышению его количества в почве (12). Cd также может поступать в окружающую среду со сточными водами, где его содержание иногда достигает значительных величин (13, 14).

Загрязнение биосферы Cd оказывает токсическое действие на растения. Это проявляется в задержке их роста, повреждении корневой системы, хлорозе и некрозе листьев (9, 15). Отмечены изменения различных физиолого-биохимических процессов, включая фотосинтез, дыхание, водный обмен, а также поглощение, транспорт и усвоение минеральных питательных веществ (16-18). Это касается и образования вторичных метаболитов, в том числе полифенолов, характерная особенность которых — высокая биологическая активность (9, 19, 20).

Полифенолы разнообразны по структуре и свойствам (20, 21). Их содержание и состав видо- и органоспецифичны, зависят от возраста растений и стадии онтогенеза (22, 23). Фенольные соединения выполняют также важную роль в качестве веществ-антиоксидантов благодаря способности взаимодействовать с активными формами кислорода (АФК), количество которых повышается при стрессах, в том числе при воздействии тяжелых металлов (24, 25).

Несмотря на значительное число работ по изучению влияния тяжелых металлов, в том числе Cd, на растения наши знания о его действии до сих пор недостаточны. Это касается и льна, который значительно отлича-

ется от других полевых культур спецификой метаболизма и, как следствие, продуктивностью (26, 27). Сообщалось об образовании у представителей рода *Linum* соединений фенольной природы — *n*-гидроксibenзойной, хлорогеновой, феруловой и *n*-кумаровой кислот, а также лигнанов (28, 29, 30). Однако эти данные крайне фрагментарны и не дают четких представлений о характере накопления различных классов полифенолов в растениях льна.

При изучении метаболизма растений, а также их ответной реакции на воздействие различных факторов, в том числе тяжелых металлов, успешно используются методы биотехнологии, в частности *in vitro* стерильные проростки (31, 32). Их преимущества — возможность проводить лабораторные исследования круглогодично (вне зависимости от погодных условий и времени года), а также стерильность материала и контроль условий выращивания, что позволяет изучать ответные реакции и модельных систем растений на воздействие различных экзогенных факторов.

В представленной работе впервые исследовано праймерное действие кадмия на *in vitro* проростки льна и продемонстрированы ответные реакции этих растений-аккумуляторов на присутствие поллютанта.

Цель работы — сравнение влияния кадмия на *in vitro* проростки льна прядильного, масличного и декоративного назначения по морфофизиологическим характеристикам, интенсивности перекисного окисления липидов и содержанию фенольных соединений, в том числе фенилпропаноидов и флавоноидов.

**Методика.** Объектом исследования были *in vitro* стерильные проростки льна обыкновенного (*Linum usitatissimum* L.) (лен-долгунец сорта Ленок и лен масличный сорта Санлин), а также льна крупноцветкового (*Linum grandiflorum* Desf., сорт Red). Для получения проростков семена последовательно стерилизовали 0,01 % водным раствором перманганата калия (7 мин) и 0,1 % раствором двухлористой ртути (8 мин). После каждой обработки материал 3-5 раз промывали стерильной дистиллированной водой. Подготовленные таким образом семена помещали на содержащие сахарозу (2 %) безгормональные агаризованные питательные среды Мурасиге-Скуга (лен-долгунец и лен масличный) и Гамборга В5 (лен крупноцветковый). Стерильные проростки выращивали в факторостатной камере (ИФР РАН) при 25 °С, 70 % относительной влажности воздуха, 16-часовом фотопериоде и интенсивности света 50 мкМ/(м<sup>2</sup> · с).

При проведении эксперимента 14-суточные проростки льна подвергали экзогенному воздействию 75 мкМ водного раствора Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (опытный вариант) или воды (контрольный вариант), которые вносили в прикорневую зону, используя для этого стерилизующую фильтрующую насадку SLGV033NS (Millipore, «Sigma-Aldrich», США). Выбор используемой концентрации обусловлен отсутствием ингибирующего действия кадмия на рост проростков льна (33). После 7 сут воздействия анализировали морфометрические параметры проростков и содержание в них воды. Надземные части фиксировали в жидком азоте и хранили в холодильнике при –80 °С для последующих биохимических определений.

Морфофизиологическое состояние культур оценивали по их внешним характеристикам (цвет, плотность, наличие некротических участков). У 10 проростков в каждом варианте измеряли длину гипокотыля и главного корня.

Содержание воды в растительных тканях (5 растений в одной биологической повторности каждого варианта) определяли после их высушивания до постоянной массы при +70 °С и выражали в процентах (34).

Содержание Cd (15 растений в одной биологической повторности каждого варианта) анализировали в растительном материале после минерализации в течение 24 ч при 25 °С в растворах концентрированных HNO<sub>3</sub> и HClO<sub>4</sub> (2:1 v/v), после чего инкубировали в термостате TDB-A-400 при 150 °С и 180 °С (35). Содержание Cd измеряли на атомно-абсорбционном спектрофотометре Формула ФМ-400 (ООО «НТЦ ЛабИст», Россия) с применением ламп с полым катодом («Hamamatsu Photonics К.К.», Япония) и выражали в мкг/г сухой массы. Для калибровки прибора использовали растворы нитрата кадмия в различной концентрации, приготовленные из стандартного раствора Cd ГСО 7874-2000.

Фенольные соединения извлекали 96 % этанолом из замороженного и измельченного растительного материала (7 растений в одной биологической повторности каждого варианта) при 45 °С в течение 45 мин. Экстракты центрифугировали (13000 об/мин, 15 мин), надосадочную жидкость использовали для спектрофотометрического определения разных классов фенольных соединений (36, 37). Содержание суммы фенольных соединений определяли с реактивом Фолина-Чокольтеу при  $\lambda = 725$  нм, содержание фенилпропаноидов — методом прямого спектрофотометрирования растворов при  $\lambda = 330$  нм, флавоноидов — с 2 % раствором хлорида алюминия при  $\lambda = 510$  нм. Содержание суммы фенольных соединений и флавоноидов выражали в мг-экв. рутина/г сухой массы, содержание фенилпропаноидов — в мг-экв. кофейной кислоты/г сухой массы.

Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли в растительном материале, используя реакцию с тиобарбитуровой кислотой (38). Для этого навеску (7 растений в одной биологической повторности каждого варианта) замороженных в жидком азоте тканей гомогенизировали в 0,1 М Трис-HCl буфере (рН 7.5), содержащем 0,35 М NaCl. Затем добавляли 0,5 % раствор тиобарбитуровой кислотой в 20 % трихлоруксусной кислоте и инкубировали на кипящей водяной бане. Через 30 мин реакционную смесь охлаждали, надосадочную жидкость отделяли и измеряли ее оптическую плотность при  $\lambda = 532$  нм (спектрофотометр Specord M40, «Carl Zeiss, AG», Германия). Для расчета содержания малонового диальдегида (МДА) использовали коэффициент молярной экстинкции  $\epsilon$ , равный  $1,56 \times 10^{-5} \text{ см}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$  (39).

Все определения проводили в трех биологических и трех аналитических повторностях. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы Microsoft Excel 2010 и SigmaPlot12.2 (анализ ANOVA). На рисунках представлены средние арифметические значения определений ( $M$ ) и их стандартные ошибки ( $\pm \text{SEM}$ ). Достоверность различий средних значений оценивали по  $t$ -критерию Стьюдента при  $p \leq 0,05$  и обозначали ее разными латинскими буквами.

*Результаты.* Морфофизиологические характеристики растений служат важными показателями их онтогенетического развития и продукционной способности (40). Для льна более медленный рост надземной части относительно корневой системы отмечен после завершения онтогенетических фаз «всходы» и «елочка» (41). У *in vitro* проростков льна-долгунца и льна масличного в контрольном варианте развитие соответствовало норме (рост корневой системы происходил более интенсивно относительно гипокотыля) (таб.).

Иная тенденция выявлена у льна крупноцветкового, где более эффективным был рост надземной части (см. таб.). Это согласуется с данными других исследователей, сообщавших об отличиях в характере его

роста от такового у двух других представителей рода *Linum* в естественных условиях произрастания (42).

**Морфометрические показатели и содержание воды в *in vitro* проростках льна-долгунца (сорт Ленок), льна масличного (сорт Санлин) (лен обыкновенный *Linum usitatissimum* L.) и льна крупноцветкового (сорт Red) (*L. grandiflorum* Desf.) в контроле (К) и под влиянием кадмия (Cd) ( $M \pm SEM$ , факторостатная камера)**

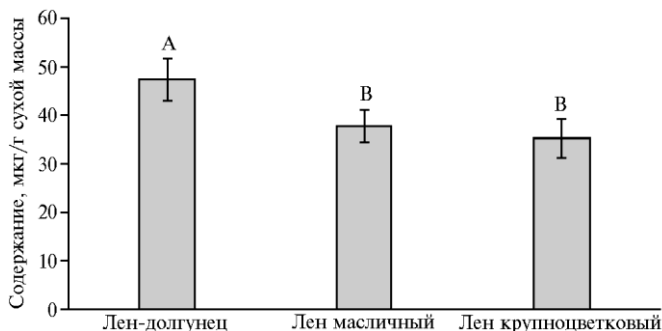
Сорт	Длина главного корня, см		Высота проростка, см		Содержание воды, %	
	К	Cd	К	Cd	К	Cd
Ленок	8,4±0,7 <sup>Aa</sup>	7,5±0,6 <sup>Ba</sup>	6,3±0,7 <sup>Aa</sup>	7,0±0,6 <sup>Aa</sup>	93,1±0,1 <sup>Ab</sup>	94,4±0,2 <sup>Aa</sup>
Санлин	10,0±0,9 <sup>Aa</sup>	9,0±0,9 <sup>Aa</sup>	6,1±0,7 <sup>Aa</sup>	7,0±0,8 <sup>Aa</sup>	93,3±0,2 <sup>Aa</sup>	93,7±0,8 <sup>Aa</sup>
Red	3,3±0,4 <sup>Ca</sup>	2,8±0,3 <sup>Ca</sup>	5,9±0,6 <sup>Aa</sup>	4,9±0,6 <sup>Bb</sup>	90,0±0,1 <sup>Ba</sup>	90,5±0,3 <sup>Ba</sup>

**П р и м е ч а н и е.** Измерения морфометрических показателей проводили на 10 проростках каждого варианта, содержание воды определяли в трех биологических повторностях. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы Microsoft Excel 2010 и SigmaPlot12.2. Разными латинскими буквами отмечены статистически значимые различия между вариантами при  $p \leq 0,05$  (ANOVA): прописными — между разновидностями льна контрольных и опытных вариантов, строчными — внутри каждой разновидности.

Следует отметить, что максимальные показатели длины главного корня характерны для контрольного варианта *in vitro* проростков льна масличного, которые превышали таковые у льна-долгунца и льна крупноцветкового соответственно на 16 и 67 % ( $p \leq 0,05$ ). Что касается высоты проростка, то анализируемый показатель у этих контрольных вариантов имел близкие значения (см. табл.). Все перечисленное свидетельствует о том, что при выращивании проростков льна в условиях *in vitro* видоспецифичность проявляется только при формировании корневой системы. Такая реакция может быть следствием ранних этапов онтогенеза растений льна (41, 43).

Воздействие такого металла, как Cd, в большинстве случаев ингибирует рост растений, а также влияет на митотический цикл и подавляет процесс деления клеток (9, 44, 45). У *in vitro* проростков всех разновидностей льна прослеживалась тенденция к уменьшению длины главного корня. Так, у льна-долгунца и льна масличного на среде с Cd главный корень был короче относительно контрольного варианта соответственно на 10,8 и 10,5 % ( $p \leq 0,05$ ), тогда как у льна крупноцветкового — на 15,1 % ( $p \leq 0,05$ ). Аналогичная тенденция характерна и для гипокотыля льна крупноцветкового (снижение на 16,9 %,  $p \leq 0,05$ ). При этом у *in vitro* проростков льна-долгунца и льна масличного в условиях действия Cd наблюдалась тенденция к незначительному увеличению длины гипокотыля относительно контроля — соответственно на 11,1 и 14,7 % ( $p \leq 0,05$ ). Следовательно, эти разновидности льна различаются по физиолого-биохимическим параметрам, что и определяет их ответную реакцию на действие Cd.

Содержание воды в растительных тканях относится к значимым показателям их физиологического состояния, которое особенно важно при изменении условий роста или действии экзогенных факторов (46). Согласно нашим данным, этот показатель не различался у *in vitro* проростков льна-долгунца и льна масличного и был немного выше, чем у льна крупноцветкового (см. табл.). Эта тенденция отмечалась как для контрольных, так и для опытных вариантов. Воздействие Cd не влияло на содержание воды в *in vitro* проростках, исключением оказался лен-долгунец, у которого этот показатель незначительно, но статистически значимо повышался. Такой эффект обусловлен инициацией процессов вакуолизации растительных клеток, как отмечалось другими исследователями (47).

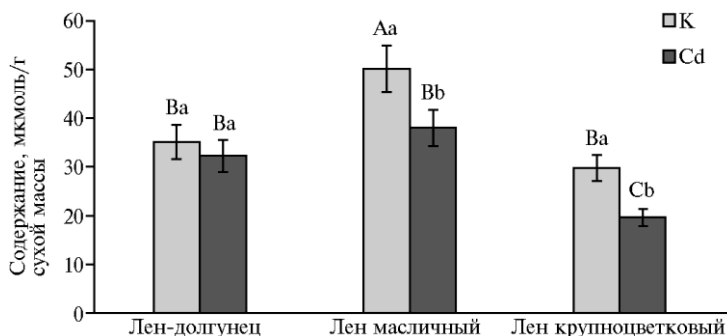


**Рис. 1.** Содержание кадмия в *in vitro* проростках льна-долгунца (сорт Ленок), льна масличного (сорт Санлин) (лен обыкновенный *Linum usitatissimum* L.) и льна крупноцветкового (сорт Red) (*L. grandiflorum* Desf.), выращиваемых в присутствии металла в течение 7 сут. Определения проводили в трех биологических и трех аналитических повторностях ( $M \pm SEM$ , факторостатная камера). Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы Microsoft Excel 2010 и SigmaPlot12.2. Латинскими буквами обозначены статистически значимые различия между вариантами при  $p \leq 0,05$  (ANOVA).

Лен относится к растениям-аккумуляторам, способным накапливать тяжелые металлы не только при их высокой концентрации в почве, но и при низкой (48, 49). Согласно нашим данным, Cd поступал в надземные органы *in vitro* проростков льна (рис. 1). Наибольшее его содержание отмечено у льна-долгунца. Оно превышало этот показатель у льна масличного и льна крупноцветкового на соответственно 20,2 и 23,6 % ( $p \leq 0,05$ ). Следовательно, *in vitro* проростки льна-долгунца эффективно аккумулируют Cd, что отмечалось для льна прядильного назначения в условиях *in vivo* (50).

Редокс-гомеостаз в клетках растений, обусловленный содержанием АФК, представляет собой существенную составляющую метаболизма (51, 52). Показателем редокс-гомеостаза служит уровень ПОЛ, оцениваемый по содержанию МДА (38). Следует отметить, что АФК всегда образуются в клетках растений, однако их уровень может значительно повышаться при действии экзогенных факторов, в том числе Cd (9, 53).

Определение содержания МДА показало его различия у *in vitro* проростков трех разновидностей льна в контрольных вариантах (рис. 2).



**Рис. 2.** Содержание малонового диальдегида в *in vitro* проростках льна-долгунца (сорт Ленок), льна масличного (сорт Санлин) (лен обыкновенный *Linum usitatissimum* L.) и льна крупноцветкового (сорт Red) (*L. grandiflorum* Desf.) в контроле (K) и при воздействии кадмия (Cd). Определения проводили в трех биологических и трех аналитических повторностях ( $M \pm SEM$ , факторостатная камера). Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы Microsoft Excel 2010 и SigmaPlot12.2. Разными латинскими буквами обозначены статистически значимые различия между вариантами при  $p \leq 0,05$  (ANOVA): прописными — между разновидностями льна контрольных и опытных вариантов, строчными — внутри каждой разновидности.

У льна масличного мы отмечали наибольший показатель, который превышал таковой у льна-долгунца (на 30 %,  $p \leq 0,05$ ) и особенно у льна крупноцветкового (на 40,5 %,  $p \leq 0,05$ ). Это свидетельствует о различиях в функциональной активности редокс-потенциала у трех представителей рода *Linum* в условиях *in vitro*.

При действии Cd у *in vitro* проростков у льна-долгунца содержание МДА оставалось на уровне контроля, тогда как у льна масличного и льна крупноцветкового оно снижалось (соответственно на 24,2 и 34,2 %,  $p \leq 0,05$ ). Следствием этих изменений стало практически равное его содержание у льна-долгунца и льна масличного в отличие от льна крупноцветкового, у которого содержание МДА было ниже (соответственно в 1,6 и 1,9 раза).

Таким образом, воздействие Cd приводило к изменениям в функционировании антиоксидантной системы у *in vitro* проростков льна масличного и льна крупноцветкового. Это проявлялось в уменьшении содержания МДА, что свидетельствует о возможной активации защитных систем, снижении количества АФК в клетках и нормализации баланса про- и антиоксидантов. О влиянии экзогенных факторов, в том числе тяжелых металлов, на антиоксидантную систему растений сообщалось в литературе (51, 54).

К эффективным антиоксидантам в клетках растений относятся фенольные соединения — представители низкомолекулярных (неферментативных) антиоксидантов (19, 55). В последние годы их рассматривают в качестве так называемой второй линии защиты от АФК, поскольку активность высокомолекулярных (ферментативных) антиоксидантов первой линии более выражена при первичном воздействии стресса (51).

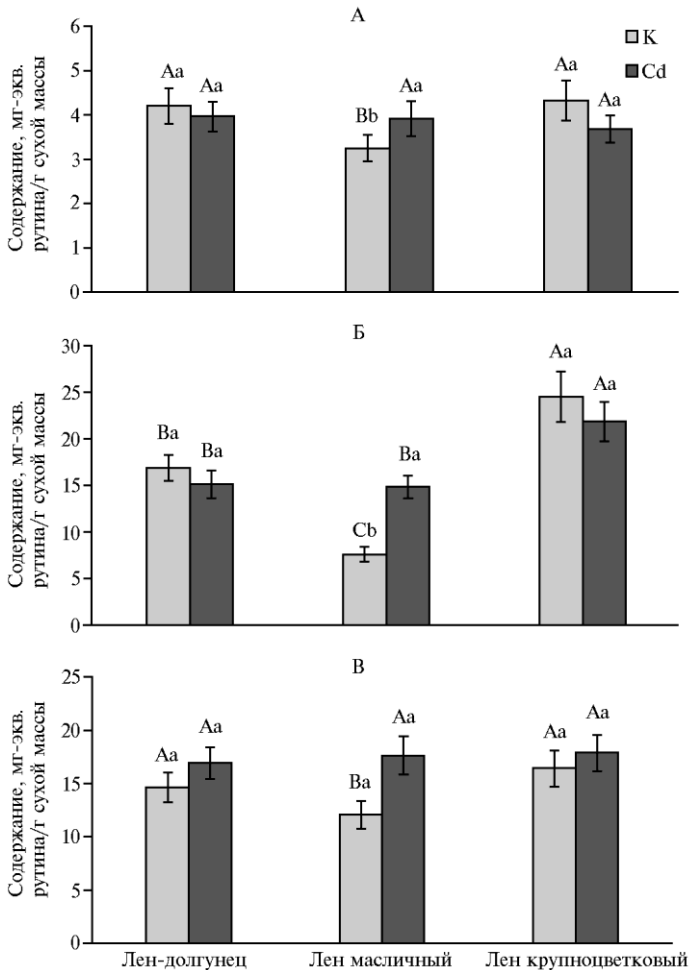
Определение суммарного содержания фенольных соединений позволяет оценить способность растительных тканей к образованию этих низкомолекулярных антиоксидантов (36). Согласно представленным данным (рис. 3, А), в *in vitro* проростках льна-долгунца и льна крупноцветкового в контрольном варианте оно было статистически равным и значительно превышало таковое у льна масличного (на 22,6% в обоих случаях).

При экзогенном действии Cd у *in vitro* проростков льна-долгунца и льна крупноцветкового статистически достоверных изменений в содержании суммы фенольных соединений мы не отмечали. Иная тенденция характерна для льна масличного, у которого оно повышалось на 14 % ( $p \leq 0,05$ ). Следствием этих изменений стало практически равное суммарное содержание фенольных соединений у разных представителей льна *in vitro* при действии Cd.

Фенилпропаноиды — характерные для растений льна биогенетически ранние фенольные соединения (19). Их содержание в контроле было максимальным у *in vitro* проростков льна крупноцветкового, которое превышало таковое у льна-долгунца (на 31 %,  $p \leq 0,05$ ) и особенно у льна масличного (на 70 %,  $p \leq 0,05$ ) (см. рис. 3, Б). Полученные данные свидетельствуют об особенностях образования фенилпропаноидов у льна масличного, что проявляется в их незначительном накоплении у этой культуры, специализированный метаболизм которой направлен на синтез полиненасыщенных жирных кислот (5).

При экзогенном действии Cd содержание фенилпропаноидов у *in vitro* проростков льна-долгунца и льна крупноцветкового не изменялось относительно контрольного варианта. Иная тенденция характерна для льна масличного, у которого оно повышалось практически на 49 % ( $p \leq 0,05$ ). В результате таких изменений содержание фенилпропаноидов у льна-долгунца

и льна масличного при действии кадмия становилось практически равным, хотя в обоих случаях остается ниже такового у льна крупноцветкового на 31 % ( $p \leq 0,05$ ). Полученные данные указывают на повышенную способность последнего к накоплению обсуждаемых биогенетически ранних фенольных метаболитов (как в контроле, так и при действии Cd) относительно двух других разновидностей льна. Это согласуется с ранее полученными нами данными по активации биосинтеза фенолпропаноидов в каллусной культуре льна крупноцветкового при действии дрожжевого экстракта (56).



**Рис. 3.** Суммарное содержание фенольных соединений (А), фенилпропаноидов (Б) и флаваноидов (В) в *in vitro* проростках льна-долгунца (сорт Ленок), льна масличного (сорт Санлин) (лен обыкновенный *Linum usitatissimum* L.) и льна крупноцветкового (сорт Red) (*L. grandiflorum* Desf.) в контроле (К) и при воздействии кадмия (Сd). Определения проводили в трех биологических и трех аналитических повторностях ( $M \pm SEM$ , факторостатная камера). Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы Microsoft Excel 2010 и SigmaPlot12.2. Разными латинскими буквами обозначены статистически значимые различия между вариантами при  $p \leq 0,05$  (ANOVA): прописными — между разновидностями льна контрольных и опытных вариантов, строчными — внутри каждой разновидности.

Флавоноиды — одни из наиболее распространенных в надземных органах растений фенольных метаболитов (19). Из большее и практически равное содержание мы отмечали у *in vitro* проростков льна-долгунца и льна крупноцветкового, которое превышало таковое у льна масличного соответственно на 17,4 и 24,4 % ( $p \leq 0,05$ ) (см. рис. 3, В). После воздей-



ствия Cd во всех исследованных вариантах содержание флавоноидов было равным и достоверно повышалось только у льна масличного (на 31,4 %,  $p \leq 0,05$ ). На основании этих данных можно сделать заключение об отсутствии ответной реакции на действие Cd у *in vitro* проростков льна-долгунца и льна крупноцветкового. Что касается льна масличного, то для него характерно увеличение содержания флавоноидов, являющееся, по-видимому, следствием активации флавоноидного пути фенольного метаболизма.

Полученные нами данные позволяют предположить возможность выращивания льна масличного и льна-долгунца в неблагоприятных агро-экологических условиях: льна масличного — за счет инактивации поллютанта благодаря функционированию неферментативной антиоксидантной системы, а льна прядильной разновидности — учитывая его стратегию увеличения аккумуляции металла в инертных клеточных органеллах.

Итак, представленные в настоящем сообщении данные свидетельствуют о различиях в ответных реакциях *in vitro* проростков разновидностей льна — льна-долгунца (сорт Ленок), льна масличного (сорт Санлин) (*Linum usitatissimum* L.), а также льна крупноцветкового (*Linum grandiflorum* Desf, сорт Red) на действие Cd. В присутствии поллютанта происходило ингибирование морфометрических параметров, что в разной степени было для них характерно и, по-видимому, обусловлено подавлением деления клеток за счет влияния металла на процессы митотического цикла. Следует отметить активацию функций антиоксидантной системы у *in vitro* проростков льна масличного и льна крупноцветкового при действии кадмия. Этот процесс у льна масличного назначения сопровождался повышением суммарного содержания фенольных соединений, увеличением содержания биогенетически ранних фенольных метаболитов — фенилпропаноидов, а также флавоноидов как индикаторов активации флавоноидного пути фенольного метаболизма, что было не характерно для двух других разновидностей *in vitro* проростков льна. Разная степень выраженности изменений морфометрических и физиолого-биохимических показателей обусловлены видоспецифичностью изучаемых объектов. Полученные данные указывают на наличие у льна масличного и льна-долгунца фиторемедиационной способности. Эти культуры можно использовать при техногенном загрязнении среды, что благотворно повлияет на экологическую обстановку в регионах их возделывания.

ФГБУН Институт физиологии растений  
им. К.А. Тимирязева РАН,  
127276 Россия, г. Москва, Ботаническая ул., 35,  
e-mail: goncharuk.ewgenia@yandex.ru ✉, NechaevaTatyana.07@yandex.ru,  
botanius@yandex.ru, nzagoskina@mail.ru

Поступила в редакцию  
23 августа 2024 года

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2024, V. 59, № 5, pp. 995-1007

## CULTIVATION OF FLAX (*Linum* L.) SPROUTS AND THEIR RESPONSE TO THE CADMIUM IONS' EFFECT *in vitro*: THE STRESS REACTION LEVEL AND POLYPHENOLS ACCUMULATION

E.A. Goncharuk ✉, T.L. Nechayeva, A.V. Kartashov, N.V. Zagoskina

Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, 35, Botanicheskaya ul., Moscow, 127276 Russia, e-mail goncharuk.ewgenia@yandex.ru (✉ corresponding author), NechaevaTatyana.07@yandex.ru, botanius@yandex.ru, nzagoskina@mail.ru

ORCID:

Goncharuk E.A. [orcid.org/0000-0002-9280-9450](https://orcid.org/0000-0002-9280-9450)

Nechayeva T.L. [orcid.org/0000-0003-3341-4763](https://orcid.org/0000-0003-3341-4763)

The authors declare no conflict of interests

Kartashov A.V. [orcid.org/0000-0001-8556-8719](https://orcid.org/0000-0001-8556-8719)

Zagoskina N.V. [orcid.org/0000-0002-1457-9450](https://orcid.org/0000-0002-1457-9450)

## Abstract

In the species diversity of the genus *Linum* L., represented by more than 200 species, the only cultivated one is *Linum usitatissimum* L. The most popular flax products (or flax cultivation products) include high-strength flax fiber, its processed products — cake and chaff, as well as highly nutritious flaxseed oil as a source of short-chain polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids, linolenic acid, vitamins A, B, D and E, fiber and protein. High decorativeness of flax in landscapes are also noted. Today, the ecological situation in flax-growing regions is unfavorable, including due to environmental pollution with heavy metals, in particular cadmium (Cd), a highly toxic and mobile element of the first hazard class in the soil solution. Its priming action inhibits physiologically important growth processes, increases the generation of active oxygen forms, and initiates the oxidation of proteins and lipids. All this disrupts the efficient functioning and activity of the antioxidant system in plants, including its non-enzymatic component, represented by low-molecular antioxidants, including polyphenols. The latter are capable of interacting with active forms of oxygen, the amount of which increases under the influence of Cd. In this work, the stress response to the action of this representative of heavy metals in *in vitro* seedlings of three varieties of flax as a model biotechnological system was assessed for the first time, and their ability to accumulate polyphenols, effective bio-antioxidants and the main components of the phenolic complex, was studied. A comparison of *in vitro* responses of seedlings to the action of Cd was carried out when assessing their morphophysiological characteristics, the level of lipid peroxidation (LPO) and the content of phenolic compounds, including phenylpropanoids and flavonoids. The objects of the study were *in vitro* sterile seedlings of fibre flax (variety Lenok), oil flax (variety Sanlin) (*L. usitatissimum*), and ornamental flax (large-flowered flax, variety Red) (*L. grandiflorum* Desf.). To obtain them, sequential sterilization of seeds was carried out, which were then placed on sucrose-containing (2 %) hormone-free agar nutrient media Murashige-Skoog (fibre flax and oil flax) and Gamborg B5 (large-flowered flax). During the experiment, 14-day-old flax seedlings were exposed to exogenous action of 75  $\mu\text{M}$  aqueous solution of cadmium nitrate (experimental treatment) or water (control treatment) by introducing into the root zone. After 7-day exposure, morphometric parameters of seedlings (length of hypocotyl and main root) and their water content were analyzed. Biochemical determinations were carried out in plant material fixed with liquid nitrogen. The Cd content was analyzed by atomic absorption spectrophotometry. Phenolic compounds were extracted with 96% ethanol, and the content of the sum of phenolic compounds, phenylpropanoids, and flavonoids was determined spectrophotometrically. The LPO level was assessed by the reaction with thiobarbituric acid. It was found that *in vitro* seedlings of three flax varieties differed in physiological and biochemical parameters, which determines their response to the action of Cd. Already in the early stages of ontogenesis *in vitro*, species specificity was manifested in the formation of the root system, the formation of LPO reaction products, the accumulation of phenolic compounds and the absorption of the heavy metal. The highest Cd content was found in *in vitro* flax seedlings, a more efficient Cd accumulator compared to oil flax and large-flowered flax. It exceeded this indicator for oil flax and large-flowered flax by 20.2 and 23.6 %, respectively ( $p \leq 0.05$ ). The LPO level decreased only in oil flax and large-flowered flax by 24.2 and 34.2 %,  $p \leq 0.05$ , respectively, compared to the control, which indicates activation of their defense systems in response to the pollutant. An increase in the total content of phenolic compounds, as well as their various classes (phenylpropanoids and flavonoids) in response to the action of Cd occurred only in oil flax (by 14 %, 70 % and 49 %, respectively,  $p \leq 0.05$ ) vs. the control, which indicates the process of activation of protective systems. All the data obtained demonstrate different responses *in vitro* of seedlings of the three flax varieties to the action of Cd, which are due to their species specificity. Under these conditions, a more pronounced response at the level of phenolic metabolism is characteristic of oil flax, which was distinguished by a high ability to form these secondary compounds and activation of the functioning of the antioxidant system relative to two other representatives of the genus *Linum*.

Keywords: *in vitro* sprouts, cadmium, morphology, lipid peroxidation, polyphenols, *Linum usitatissimum* L.

## REFERENCES

1. Rogers C.M. The systematics of *Linum* sect. *Linopsis* (*Linaceae*). *Plant Systematics and Evolution*, 1982, 140(2-3): 225-334 (doi: 10.1007/bf02407299).
2. Svetlova A.A. *Novosti sistematiki vysshikh rasteniy*, 2010, 41: 99-65 (doi:

- 10.31111/novitates/2010.41.99) (in Russ.).
3. Ramesh M.J.P.I.M.S. Flax (*Linum usitatissimum* L.) fibre reinforced polymer composite materials: A review on preparation, properties and prospects. *Progress in Materials Science*, 2019, 102: 109-166 (doi: 10.1016/j.pmatsci.2018.12.004).
  4. Pisupati A., Willaert L., Goethals F., Uyttendaele W., Park C.H. Variety and growing condition effect on the yield and tensile strength of flax fibers. *Industrial Crops and Products*, 2021, 170: 113736 (doi: 10.1016/j.indcrop.2021.113736).
  5. Yang J., Wen C., Duan Y., Deng Q., Peng D., Zhang H., Ma H. The composition, extraction, analysis, bioactivities, bioavailability and applications in food system of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) oil: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 2021, 18: 252-260 (doi: 10.1016/j.tifs.2021.09.025).
  6. Page J., Amziane S., Gmina M., Djelal C., Audonnet F. Using linseed oil as flax fibre coating for fibre-reinforced cementitious composite. *Industrial Crops and Products*, 2021, 161: 113168 (doi: 10.1016/j.indcrop.2020.113168).
  7. Asad B., Khan T., Gul F.Z., Ullah M.A., Drouet S., Mikac S., Garros L., Ferrier M., Bose S., Munsch T., Tungmunnithum D., Lanoue A., Giglioli-Guivarc'h N., Hano C., Abbasi B.H. Scarlet flax *Linum grandiflorum* (L.) in vitro cultures as a new source of antioxidant and anti-inflammatory lignans. *Molecules*, 2021, 26 (15): 4511 (doi: 10.3390/molecules26154511).
  8. Villalvazo-Hernández A., Burgos-Hernández M., González D. Phylogenetic analysis and flower color evolution of the subfamily *Linoideae* (*Linaceae*). *Plants*, 2022, 11(12): 1579 (doi: 10.3390/plants11121579).
  9. Goncharuk E.A., Zagorskina N.V. Heavy metals, their phytotoxicity, and the role of phenolic antioxidants in plant stress responses with focus on cadmium: review. *Molecules*, 2023, 28: 3921 (doi: 10.3390/molecules28093921).
  10. Yang G.L., Zheng M.M., Tan A.J., Liu Y.T., Feng D., Lv S. M. Research on the mechanisms of plant enrichment and detoxification of cadmium. *Biology*, 2021, 10(6): 544 (doi: 10.3390/biology10060544).
  11. Andresen E., Küpper H. Cadmium toxicity in plants. *Metal Ions in Life Sciences*, 2013, 11: 395 (doi: 10.1007/978-94-007-5179-8\_13).
  12. Ulrich A.E. Cadmium governance in Europe's phosphate fertilizers: Not so fast? *Science of the Total Environment*, 2019, 650: 541-545 (doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.09.014).
  13. Li B., Chen Z., Li Y., Yang W., Wang W. Visualization analysis of graphene and its composites for heavy metal wastewater applications. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26: 27752-27760 (doi: 10.1007/s11356-019-05983-5).
  14. Hui C.Y., Guo Y., Li H., Gao C.X., Yi J. Detection of environmental pollutant cadmium in water using a visual bacterial biosensor. *Scientific reports*, 2022, 12(1): 6898 (doi: 10.1038/s41598-022-11051-9).
  15. Zulfiqar U., Ayub A., Hussain S., Waraich E.A., El-Esawi M.A., Ishfaq M., Ahmad M., Ali M., Maqsood M.F. Cadmium toxicity in plants: Recent progress on morpho-physiological effects and remediation strategies. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2022, 22: 212-269 (doi: 10.1007/s42729-021-00645-3).
  16. Ivanov A.A., Kosobryukhov A.A. Ecophysiology of plants under cadmium toxicity: Photosynthetic and physiological responses. In: *Plant ecophysiology and adaptation under climate change: mechanisms and perspectives I*. Springer: Singapore, 2020: 429-484 (doi: 10.1007/978-981-15-2156-0\_15).
  17. Khaliq M.A., James B., Chen Y.H., Saqib H.S.A., Li H.H., Jayasuriya P., Guo W. Uptake, translocation, and accumulation of Cd and its interaction with mineral nutrients (Fe, Zn, Ni, Ca, Mg) in upland rice. *Chemosphere*, 2019, 215: 916-924 (doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.10.077).
  18. Cuyper A., Vanbuel I., Iven V., Kunnen K., Vandionant S., Huybrechts M., Hendrix S. Cadmium-induced oxidative stress responses and acclimation in plants require fine-tuning of redox biology at subcellular level. *Free Radical Biology and Medicine*, 2023, 199: 81-96 (doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2023.02.010).
  19. Zagorskina N.V., Zubova M.Y., Nechaeva T.L., Kazantseva V.V., Goncharuk E.A., Katanakaya V.M., Baranova E.N., Aksenova M.A. Polyphenols in plants: structure, biosynthesis, abiotic stress regulation, and practical applications (Review). *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24: 13874 (doi: 10.3390/ijms241813874).
  20. Wang Y., Lei Z., Ye R., Zhou W., Zhou Y., Zou Z., Li J., Yi L., Dai Z. Effects of cadmium on physiochemistry and bioactive substances of muskmelon (*Cucumis melo* L.). *Molecules*, 2022, 27: 2913 (doi: 10.3390/molecules27092913).
  21. Belščak-Cvitanovic A., Durgo K., Hudek A., Bacun-Družina V., Komes D. Overview of polyphenols and their properties. In: *Polyphenols: properties, recovery, and applications*. C.M. Galanakis (ed.). Elsevier, Amsterdam, 2018: 3-44 (doi: 10.1016/B978-0-12-813572-3.00001-4).
  22. Nurzyńska-Wierdak R. Phenolic compounds from new natural sources — plant genotype and ontogenetic variation. *Molecules*, 2023, 28(4): 1731 (doi: 10.3390/molecules28041731).
  23. Rogge S.A., Neugart S., Schreiner M., Meyhufer R. Phenolic compounds in different stages of ontogenesis in chrysanthemum — a potential for thrips-resistance characterisation. *Horticult-*

- turæ*, 2024, 10(8): 822 (doi: 10.3390/horticulturae10080822).
24. Moazzen A., Öztinen N., Ak-Sakalli E., Kosar M. Structure-antiradical activity relationships of 25 natural antioxidant phenolic compounds from different classes. *Heliyon*, 2022, 8: e10467 (doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e10467).
  25. Goncharova Yu.K., Goncharov S.V., Kharitonov E.M., Fotev Yu.V., Simonova V.V., Ochkas N.A. Plant antioxidants and their non-traditional sources (review). *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2024, 59(1): 39-53 (doi: 10.15389/agrobiology.2024.1.39rus).
  26. Cullis C.A. Fundamental insights into plant biology that might be offered by flax. In: *Genetics and genomics of Linum*, Springer, Cham., 2019: 261-263 (doi: 10.1007/978-3-030-23964-0\_17).
  27. Goudenhooff C., Bourmaud A., Baley C. Flax (*Linum usitatissimum* L.) fibers for composite reinforcement: exploring the link between plant growth, cell walls development, and fiber properties. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 411 (doi: 10.3389/fpls.2019.00411).
  28. Ramsay A., Fliniaux O., Quéro A., Molinié R., Demailly H., Hano C., Paetz C., Roscher A., Grand E., Kovensky J., Schneider B., Mesnard F. Kinetics of the incorporation of the main phenolic compounds into the lignan macromolecule during flaxseed development. *Food Chem.* 2017, 217: 1-8 (doi: 10.1016/j.foodchem.2016.08.039).
  29. Garros L., Drouet S., Corbin C., Decourtil C., Fidel T., de Lacour J.L., Leclerc E.A., Renouard S., Tungmunnithum D., Doussot J., Abassi B.H., Maunit B., Laine E., Fliniaux O., Mesnard F., Hano C. Insight into the influence of cultivar type, cultivation year, and site on the lignans and related phenolic profiles, and the health-promoting antioxidant potential of flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. *Molecules*, 2018, 23: 2636 (doi: 10.3390/molecules23102636).
  30. Gai F., Janiak M.A., Sulewska K., Peiretti P.G., Karamac M. Phenolic compound profile and antioxidant capacity of flax (*Linum usitatissimum* L.) harvested at different growth stages. *Molecules*, 2023, 28: 1807 (doi: 10.3390/molecules28041807).
  31. Le T.N., Luong H.Q., Li H.P., Chiu C.H., Hsieh P.C. Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) sprouts as the potential food source for bioactive properties: a comprehensive study on in vitro disease models. *Foods*, 2019, 8(11): 532 (doi: 10.3390/foods8110532).
  32. Sharde R., Tripathi M.K., Bhatt D., Tiwari S., Sharma M., Tomar Y., Tripathi N. Influence of plant growth regulators on in vitro morphogenesis in sprout culture of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Potato Research*, 2024, 67: 399-420 (doi: 10.1007/s11540-023-09640-w).
  33. Goncharuk E.A., Zagorskina N.V. *Subtropicheskoe i dekorativnoe sadovodstvo*, 2018, 64: 144-149 (in Russ.).
  34. Rogozhin V.V., Rogozhina T.V. *Praktikum po fiziologii i biokhimii rasteniy* [Practical training in plant physiology and biochemistry]. St. Petersburg, 2013 (in Russ.).
  35. Shevyakova N.I., Il'ina E.N., Stetsenko L.A., Kuznetsov V.V. Nickel accumulation in rape shoots (*Brassica napus* L.) increased by putrescine. *International Journal of Phytoremediation*, 2011, 13(4): 345-356 (doi: 10.1080/15226514.2010.495147).
  36. Nikolaeva T.N., Lapshin P.V., Zagorskina N.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2021, 2: 291-299 (doi: 10.14258/jcprm.2021028250) (in Russ.).
  37. Goncharuk E.A., Kazantseva V.V., Zagorskina N.V. Effect of hypothermia on the composition of phenolics in buckwheat plants with different ploidy. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2021, 68: 1227-1235 (doi: 10.1134/S1021443721050046).
  38. Barriuso B., Astiasarán I., Ansorena D. A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task. *European Food Research and Technology*, 2013, 236: 1-15 (doi: 10.1007/s00217-012-1866-9).
  39. Hodges D.M., DeLong J.M., Forney C.F., Prange R.K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 1999, 207(4): 604-611 (doi: 10.1007/s004250050524).
  40. Serebryakova T.I., Voronin N.S., Elenevskiy A.G., Batygina T.B., Shorina N.I., Savinykh N.P. *Botanika s osnovami fitotsenologii: Anatomiya i morfologiya rasteniy* [Botany with the basics of phytocoenology: Anatomy and morphology of plants]. Moscow, 2006 (in Russ.).
  41. Rogash A.R. *L'novodstvo* [Flax growing]. Moscow, 1967 (in Russ.).
  42. Litvinova I.I., Gladkov E.A. Introduction to cell culture used for obtaining fodder and decorative plants resistant to stress. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2012, 4: 94-99 (doi: 10.15389/agrobiology.2012.4.94eng).
  43. Zhuchenko A.A. *Adaptivnaya sistema selektsii rasteniy (ekologogeneticheskie osnovy)* [Adaptive system of plant breeding (ecological and genetic foundations)]. Moscow, 2001 (in Russ.).
  44. Seregin I.V., Ivanov V.B. *Fiziologiya rasteniy*, 2001, 4: 606-630 (in Russ.).
  45. Hendrix S., Jozefczak M., Wyjck M., Deckers J., Vangronsveld J., Cuyper A. Glutathione: A key player in metal chelation, nutrient homeostasis, cell cycle regulation and the DNA damage response in cadmium-exposed *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, 154: 498-507 (doi: 10.1016/j.plaphy.2020.06.006).
  46. Brodersen C., McElrone A. Maintenance of xylem network transport capacity: a review of embolism repair in vascular plants. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4: 108 (doi: 10.3389/fpls.2013.00108).
  47. Farjaminezhad R., Garoosi G. Prediction of the effect of chitosan on cell suspension culture of

- Azadirachta indica* by response surface methodology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2021, 146(2): 323-337 (doi: 10.1007/s11240-021-02072-9).
48. Saleem M.H., Ali S., Hussain S., Kamran M., Chattha M.S., Ahmad S., Ageel M., Rizwan M., Aliarba N.A., Alrahtani S., Abdel-Daim M.M. Flax (*Linum usitatissimum* L.): a potential candidate for phytoremediation? Biological and economical points of view. *Plants*, 2020, 9(4): 496 (doi: 10.3390/plants9040496).
  49. Siromlya T.I., Zagurskaya Yu.V. *Zhurnal obshchey biologii*, 2021, 82(4): 283-296 (doi: 10.31857/S0044459621030076) (in Russ.).
  50. Gorbunova V.A., Zubkova V.M., Belozubova N.Yu. *Agrarnaya Rossiya*, 2020, 3: 27-32 (doi: 10.30906/1999-5636-2020-3-27-32) (in Russ.).
  51. Hasanuzzaman M, Borhannuddin Bhuyan M.H.M., Zulfikar F., Raza A., Mohsin S.M., Al Mahmud J. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*, 2020, 9(8): 681-733 (doi: 10.3390/antiox9080681).
  52. Novokhatin V.V., Shelomentseva T.V., Dragavtsev V.A. A novel integrative approach to study the dynamics of an increase in common spring wheat adaptivity and homeostaticity (on the example of breeding programs in the Northern Trans-Ural). *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2022, 7(1): 81-97 (doi: 10.15389/agrobiology.2022.1.81rus).
  53. Huang H., Ullah F., Zhou D.X., Yi M., Zhao Y. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 800 (doi: 10.3389/fpls.2019.00800).
  54. Ali A.M.A., El-Nour M.E.M., Yagi S.M. Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) rhizome, callus and callus treated with some elicitors. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2018, 16(2): 677-682 (doi: 10.1016/j.jgeb.2018.03.003).
  55. Pradedova E.V., Isheeva O.D., Salyaev R.K. *Fiziologiya rasteniy*, 2011, 58(2): 177-185 (in Russ.).
  56. Goncharuk E.A., Saibel O.L., Zaitsev G.P., Zagoskina N.V. The elicitor effect of yeast extract on the accumulation of phenolic compounds in *Linum grandiflorum* cells cultured in vitro and their antiradical activity. *Biology Bulletin*, 2022, 49(6): 599-607 (doi: 10.1134/S1062359022060061).