

03.02.00 – ОБЩАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 57.085.23

Статья поступила в редакцию 12.06.2018

ПЕРСПЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА РАСТЕНИЙ НА ИНДУКЦИЮ КАЛЛУСОГЕНЕЗА РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ЭКСПЛАНТОВ *HYOSCYAMUS MUTICUS L. IN VITRO*

© 2018

Абделаиз Валла Мохамед Абделмаксуд, аспирант кафедры ботаники и физиологии растений
Хуснетдинова Ландыш Завдетовна, кандидат биологических наук,
доцент кафедры ботаники и физиологии растений
Тимофеева Ольга Арнольдовна, доктор биологических наук,
профессор кафедры ботаники и физиологии растений
Казанский (Приволжский) федеральный университет (г. Казань, Российская Федерация)

Аннотация. В работе представлены результаты по изучению влияния гормонального состава среды на индукцию каллусогенеза в культуре изолированных органов белены египетской (*Hyoscyamus muticus L.*). Было испытано 11 вариантов сред Мурасиге и Скуга, дополненных ауксинами и цитокининами. Подобранны модификации питательных сред Мурасиге и Скуга для каллусогенеза. Установлено, что на среде Мурасиге и Скуга содержащей бензиламинопуридин в сочетании с нафтилукусной кислотой наблюдалось каллусообразование из разных типов эксплантов *Hyoscyamus muticus L. in vitro*. Показано, что максимальная индукция каллусогенеза из корневых эксплантов, наблюдалась при использовании среды Мурасиге и Скуга, дополненной 0,5 мг/л бензиламинопурином и 1,0 мг/л нафтилукусной кислотой, тогда как минимальное каллусообразование наблюдалось на среде, содержащей только бензиламинопуридин. Установлено, что индукция каллусогенеза из листовых и стеблевых эксплантов на питательной среде, не содержащей гормонов, а также при введении в состав среды только бензиламинопурина не отмечалась. Таким образом, на большинстве испытанных питательных сред индукция каллусогенеза выше при культивировании фрагментов корня по сравнению с листовыми и стеблевыми эксплантами белены египетской в культуре *in vitro*. Данная работа направлена на то, чтобы индуцировать образование каллуса из различных эксплантов белены египетской, которые могут быть использованы для регенерации растений и в качестве источника для получения вторичных метаболитов.

Ключевые слова: *Hyoscyamus muticus L.*; белена египетская; каллусообразование; культура *in vitro*; эксплант; вторичные метаболиты; ауксин; цитокинин; бензиламинопуридин; нафтилукусная кислота; сегменты листа, стебля, корня; среда Мурасиге и Скуга.

Введение

Hyoscyamus muticus L. – многолетнее травянистое растение семейства пасленовые (Solanaceae). Семейство Solanaceae включает в себя около 102 родов и 2460 видов, обитающих в тропических и субтропических районах. Они являются продуцентами сходных по химическому строению тропановых алкалоидов. Показано, что биологическая активность белены связана с присутствием в нем скополамина, гиосциамина и атропина [1, р. 113–119; 2, р. 39–42]. В лекарственных целях белену египетскую применяют как противоастматическое, спазмолитическое, антихолинергическое, анестезирующее и наркотическое средство.

H. muticus на территории Российской Федерации не произрастает, и постепенно вырождается в Египте из-за быстрого развития индустриализации. Этот факт определяет наши попытки разработать биотехнологические методы размножения ценного растения в целях его сохранения и получения вторичных метаболитов. Разработка таких подходов основана прежде всего на оптимизации режимов асептического культивирования тканей и органов и подборе условий индукции каллуса различных типов эксплантов [3, р. 1273–1276; 4, р. 620–626; 5, р. 423–428; 6, р. 751–756]. Целью исследований является изучение влияния культуральных сред различного гормо-

нального состава на каллусогенную активность различных типов эксплантов *H. muticus in vitro*.

Материалы и методика исследований

Материалом для исследования служили семена *H. muticus*, полученные с сельскохозяйственного факультета университета Аль-Азхар (Египет). В качестве первичных эксплантов для введения в культуру *in vitro* были использованы сегменты листьев, стеблей, корней из проростков семян белены. Для стерилизации семян использовали 1,5% раствор NaOCl в течение 10 минут, с последующим промыванием стерилизованной дистиллированной водой (4–5 раз) [7, с. 25–34] и культивировали на твердой безгормональной питательной среде Мурасиге и Скуга (МС) [8, р. 473–497] с добавлением 100 мг/л миоинозитола и 30 г/л сахарозы с 2,5 г/л фитагеля.

Культивирование эксплантов проводили на среде МС, дополненной различными комбинациями бензиламинопурина (БАП) и нафтилукусной кислоты (НУК) традиционными методами [9, с. 488]. В качестве контроля во всех экспериментах служила безгормональная питательная среда. Экспланты выращивали в культуральных помещениях при освещенности 3000 Люкс и 16-часовом фотопериоде, температуре воздуха $26 \pm 2^\circ\text{C}$, относительной влажности воздуха 70%.

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием программы OriginPro 9.0. Для представления результатов использовали среднее значение и стандартное отклонение. Достоверность различий оценивали по U тесту Mann Whitney при $p < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

При введении эксплантов в культуру *in vitro*, образование каллусной ткани происходит в результате дедифференцировки клеток исходного эксплантов и их дальнейшего деления. Экспериментальные данные, имеющиеся в литературе, свидетельствуют о том, что способность к каллусообразованию в значительной степени определяется типом и концентрацией ауксинов и цитокининов. При этом для каждого вида или даже сорта необходим различный гормональный состав питательных сред. Наши исследования также показали, что индукция образования первичного каллуса у *H. muticus* зависела от гормонального состава питательной среды и типа экспланта.

При культивировании сегментов листа, стебля и корня на среде МС использовали отдельно БАП в концентрациях 1,0, 2,0 и 3,0 мг/л и БАП в сочетании с НУК: 0,5 мг/л БАП с 0,5, 1,0, 2,0 и 3,0 мг/л НУК, и 1,0, 2,0 и 3,0 мг/л БАП с 1,0 мг/л НУК.

В ходе исследования влияния гормонального состава питательной среды на процесс индукции кал-

лусогенеза было испытано 11 модификаций стандартной среды МС, характеризующихся содержанием различных концентраций ауксина и цитокинина. Установлено, что на безгормональной питательной среде, а также при введении в состав среды только БАП не наблюдали индукции каллусогенеза из листовых и стеблевых эксплантов. На остальных исследуемых питательных средах на 35–40 дни наблюдали появление каллусной ткани.

В результате проведенных исследований было показано, что у эксплантов, полученных из сегментов листа, низкое образование каллуса наблюдали на среде МС, содержащей 0,5 мг/л БАП и 2,0 мг/л НУК (в среднем 13,64 мг/эксплант сырого каллуса и 0,48 мг/эксплант сухого каллуса) (табл. 1). Максимальное каллусообразование наблюдали при использовании 1,0 мг/л БАП в сочетании с 1,0 мг/л НУК. В среднем сырой и сухой вес каллуса составил 20,11 и 0,67 мг/эксплант соответственно.

Среда, содержащая 2,0 мг/л БАП в сочетании с 1,0 мг/л НУК, оказалась самой эффективной для индукции каллуса из стеблей *H. muticus*. Масса сырого и сухого каллуса составила 21,81 мг/эксплант и 0,90 мг/эксплант соответственно (табл. 2). Экспланты, культивировавшиеся на среде МС, дополненной 0,5 мг/л БАП в сочетании с 2,0 мг/л НУК, показали самое минимальное каллусообразование (в среднем 7,40 и 0,31 мг/эксплант сырого и сухого каллуса).

Таблица 1 – Влияние БАП и НУК на индукцию каллуса из листовых эксплантов *H. muticus*

Концентрация регуляторов роста, мг/л		Каллусообразование, %	Сырая биомасса каллуса, мг/эксплант	Сухая биомасса каллуса, мг/эксплант
БАП	НУК			
0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
1,0	0,0	0,00	0,00	0,00
2,0	0,0	0,00	0,00	0,00
3,0	0,0	0,00	0,00	0,00
0,5	0,5	100	15,28 ± 0,10	0,61 ± 0,05
0,5	1,0	100	14,08 ± 0,09	0,62 ± 0,03
0,5	2,0	100	13,64 ± 0,43	0,48 ± 0,05
0,5	3,0	100	15,19 ± 0,55	0,50 ± 0,09
1,0	1,0	100	20,11 ± 0,60	0,67 ± 0,07
2,0	1,0	100	14,58 ± 0,33	0,56 ± 0,05
3,0	1,0	100	17,07 ± 0,17	0,58 ± 0,03

Таблица 2 – Влияние БАП и НУК на индукцию каллуса из стеблевых эксплантов *H. muticus*

Концентрация регуляторов роста, мг/л		Каллусообразование, %	Сырая биомасса каллуса, мг/эксплант	Сухая биомасса каллуса, мг/эксплант
БАП	НУК			
0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
1,0	0,0	0,00	0,00	0,00
2,0	0,0	0,00	0,00	0,00
3,0	0,0	0,00	0,00	0,00
0,5	0,5	100	16,27 ± 0,43	0,64 ± 0,04
0,5	1,0	100	12,30 ± 1,54	0,40 ± 0,09
0,5	2,0	100	7,40 ± 0,48	0,31 ± 0,06
0,5	3,0	100	13,84 ± 1,24	0,49 ± 0,09
1,0	1,0	100	12,54 ± 0,63	0,40 ± 0,09
2,0	1,0	100	21,81 ± 0,94	0,90 ± 0,07
3,0	1,0	100	8,10 ± 0,28	0,25 ± 0,05

Индукция каллусогенеза из корневых эксплантов *H. muticus*, как видно из полученных данных (табл. 3), наблюдалась на среде, содержащей отдельно БАП и БАП в сочетании с НУК, тогда как на безгормональной среде каллус не образовывался.

При этом минимальное каллусообразование из корневых эксплантов наблюдали на среде МС, со-

держащей только БАП. У эксплантов, культивировавшихся на среде МС, дополненной 0,5 мг/л БАП в сочетании с 1,0 мг/л НУК, отмечали максимальное образование сырой (31,56 мг/эксплант) и сухой (1,04 мг/эксплант) биомассы.

Во многих научных исследованиях показано, что ауксины и цитокинины оказывают значительное

влияние на индукцию каллуса, тогда как безгормональная среда МС, не оказывает положительного влияния на каллусообразование у большинства растений семейства Solanaceae [10, р. 874–882; 11, р. 382–392; 12, р. 1236–1242; 13, р. 1858–1866; 14, р. 40–46; 15, р. 47–50]. В работах [16, р. 38–44], показано, что самый высокий процент индукции каллуса из листовых эксплантов *Physalis minima* Linn. наблюдали на среде МС, содержащая 2,4-Д (90%), НУК (70%) и ИУК (50%). Отмечено, что питательная

среда МС, содержащая БАП в сочетании с НУК, наиболее эффективна для индукции каллуса из листовых эксплантов *H. niger* L. и *Datura metal* [13, р. 1858–1866]. Самый высокий процент индукции каллуса наблюдали на среде МС, содержащая БАП в сочетании с НУК из листовых эксплантов *Solanum nigrum* L. [17, р. 99–103], *Withania somnifera* L. [18, р. 58–61], *Stevia rebaudiana* [19, р. 56–60], *Biophytum sensitivum* [20, р. 127–131].

Таблица 3 – Влияние БАП и НУК на индукцию каллуса из корневых эксплантов *H. muticus*

Концентрация регуляторов роста, мг/л		Каллусообразование, %	Сырая биомасса каллуса, мг/эксплант	Сухая биомасса каллуса, мг/эксплант
БАП	НУК			
0,0	0,0	0,00	0,00	0,00
1,0	0,0	80	2,13 ± 0,75	0,12 ± 0,03
2,0	0,0	100	6,88 ± 0,74	0,24 ± 0,03
3,0	0,0	73,34	1,47 ± 0,35	0,08 ± 0,03
0,5	0,5	100	28,48 ± 1,12	0,79 ± 0,08
0,5	1,0	100	31,56 ± 1,07	1,04 ± 0,04
0,5	2,0	100	13,52 ± 0,49	0,34 ± 0,04
0,5	3,0	100	18,04 ± 0,67	0,55 ± 0,04
1,0	1,0	100	24,50 ± 0,64	0,73 ± 0,06
2,0	1,0	100	19,04 ± 0,86	0,52 ± 0,06
3,0	1,0	100	14,79 ± 0,50	0,50 ± 0,02

Тем не менее, каллусная ткань в наших исследованиях лучше всего формировалась на сегментах корней, тогда как на листовых и стеблевых эксплантах наблюдали лишь единичное образование длительно культивируемого каллуса, способного к дальнейшей пролиферации (рис. 1). Через 5 недель вследствие интенсивной пролиферации, каллусные культуры, полученные из корневых эксплантов, характеризовались следующими морфологическими особенностями: однородные, рыхлые, оводненные каллусы от светло-бежевого до светло-зеленого цвета, иногда с бурыми участками.



Рисунок 1 – Каллусообразование из корневых эксплантов на среде МС, дополненной 0,5 мг/л БАП в сочетании с 1,0 мг/л НУК

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования показали, что индукция образования и интенсивность роста каллусной ткани *H. muticus in vitro* зависела от регуляторов роста и типа экспланта. Максимальное каллусообразование получено из корневых эксплантов в отличие от листовых и стеблевых сегментов. При этом следует отметить, что в питательной среде необходимо наличие регуляторов роста как цитокининовой, так и ауксиновой природы.

Список литературы:

1. Khater M.A., Elashtokhy M.M.A. Effect of growth regulators on *in vitro* production of *Hyoscyamus aureus*

L. and tropane alkaloids // International journal of ChemTech Research. 2015. Vol. 8 (11). P. 113–119.

2. Basu P. Tropane alkaloids from callus cultures, differentiated roots and shoots of *Hyoscyamus muticus* L. // Plant Biochem Biotechnol. 1998. P. 39–42.

3. Bahorun T., Troitin F., Vasseux J. Comparative polyphenolic productions in *Crataegus monogyna* callus cultures // Phytochemistry. 1994. Vol. 37 P. 1273–1276.

4. Balz J.P., Courtois D., Drieu J., Drieu K. Production of ginkgolides and bilobalide by Ginkgo biloba plants and tissue culture // Planta Medica. 1999. Vol. 65 (7). P. 620–626.

5. El-Bahr M.K., Ghanem S.A., El-Missiry M.M., El-Nasr M.M. Production of tropane alkaloids in tissue cultures of *Hyoscyamus muticus* // Fitoterapia. 1997. Vol. 68 (5). P. 423–428.

6. Zhentian L., Jervis J., Helm R.F. C-glycosidic elagitannins from white oak heartwood and callus tissues // Phytochemistry. 1999. Vol. 51 (6). P. 751–756.

7. Elmaksood W.A.M., Fawzia A., Hussein A. Bosila. *In vitro* Propagation of the Endangered Medicinal Plant *Hyoscyamus muticus* L. (Egyptian henbane) // Journal of Applied Environmental and Biological Sciences. 2016. Vol. 6 (4)1–1. P. 25–34.

8. Murashige T., Skoog F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol Plant. 1962. Vol. 15. P. 473–497.

9. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. К.: Наук. Думка, 1980. 488 с.

10. Aljibouri A.M.J., Al-samarraei K.W., Abd A.S., Mageed D.M. Alkaloids Production from Callus of *Hyoscyamus niger* L. *in vitro* // Journal of Life Sciences. 2012. Vol. 6. P. 874–882.

11. Ibrahim A.I., Abd El Kawi M., Nower A., Abdel Motaal A. Alkaloids production and organogenesis from callus of *Hyoscyamus muticus* L. *in vitro* // J. of Applied Sciences Research. 2009. Vol. 5. P. 382–392.

12. Iranbakhsh A.R., Oshagi M.A., Ebadi M. Growth and production optimization of tropane alkaloids in *Da-*

tura stramonium cell suspension culture // Pakistan Journal of Biological Sciences. 2007. Vol. 10. P. 1236–1242.

13. Abd-Rahman R., El-Din E.H., El-Said A., Khli-fa H.D. Production of scopolamine and hyoscyamine in callus and regenerate cultures of *Datura metel* (L.) // J. of Applied Science Research. 2008. Vol. 4. P. 1858–1866.

14. Mutasim M.K., Khadiga G.A.E., Rasheid S.M. Callus formation and organogenesis of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Almera // Journal of Phytology. 2010. Vol. 2 (5). P. 40–46.

15. Nistor A., Campeanu G.H., Nicoleta C., Diana K.C. Effect of auxin and cytokinin on callus induction in potato (*Solanum tuberosum* L.) explants // Agricultura Stiinta si practica. 2009. Vol. 12. P. 47–50.

16. Sandhya H., Srinath R. Role of growth regulators on *in vitro* callus induction and direct regeneration in *Physalis minima* Linn // International Letters of Natural Sciences. 2015. Vol. 44. P. 38–44.

17. Yogananth N., Bhakayaraj R., Chanthuru A., Parvathi S. Comparative analysis of solasodine from *in vitro* and *in vivo* cultures of *Solanum nigrum* Linn // Kathmandu university journal of science, engineering and technology. 2009. Vol. 5 (1). P. 99–103.

18. Adhikari S.R., Pant B. Induction and Proliferation of *in vitro* Mass of Callus of *Withania somnifera* (L.) Dunal // Research in Plant Sciences. 2013. Vol. 1 (3). P. 58–61.

19. Preethi M., Sridhar T.M., Naidu C.V. Efficient protocol for indirect shoot regeneration from leaf explants of *Stevia rebaudiana* (Bert.) – An important calorie free bio sweetener // Journal of Phytology. 2011. Vol. 3 (5). P. 56–60.

20. Shivanna M.B., Vasanthakumara M.M., Mangala C. Regeneration of *Biophytum sensitivum* (Linn.) DC. Through organogenesis and somatic embryogenesis // Indian Journal of Biotechnology. 2009. Vol. 8. P. 127–131.

FUTURE OUTLOOK OF PLANT GROWTH REGULATORS APPLICATION INFLUENCING CALLUS INDUCTION FROM DIFFERENT TYPE EXPLANT *HYOSCYAMUS MUTICUS* L. *IN VITRO*

© 2018

Abdelazez Walla Mohamed Abdelmaksood, postgraduate student of Botany and Plant Physiology Department
Khusnetdinova Landysh Zavdetovna, candidate of biological sciences,
associate professor of Botany and Plant Physiology Department
Timofeeva Olga Arnoldovna, doctor of biological sciences, professor of Botany and Plant Physiology Department
Kazan (Volga Region) Federal University (Kazan, Russian Federation)

Abstract. The article shows the results concerning the problem of the influence of the hormonal composition of the medium on callus induction in isolated from different explants of Egyptian henbane areas (on the example of *Hyoscyamus muticus* L.). The authors study 11 variants of Murashige and Skoog medium supplemented with different concentrations and combination of auxins and cytokinins. It was important to find nutrient medium modification of Murashige and Skoog for callus induction. The article describes the fact that callus formation from different explant types of *Hyoscyamus muticus* L. *in vitro* was observed on Murashige and Skoog medium fortified with benzylaminopurine and naphthylacetic acid. It shows that the maximum callus induction was observed from root explants on Murashige and Skoog's medium supplemented with 0.5 mg/l of benzylaminopurine and 1.0 mg/l of naphthylacetic acid. And minimal callus formation was observed in the area with benzylaminopurine. Callus induction of leaf and stem explants both on the hormone-free nutrient medium and with the benzylaminopurine only was not observed. Thus, the results show that the frequency of callus formation with culturing root segment is higher compared to leaf and stem segment explants (on the example of Egyptian henbane in culture *in vitro*). This work aims to inducing callus formation from various explants of Egyptian henbane, which can be used for plant regeneration or as a source for *in vitro* production of secondary metabolites.

Keywords: *Hyoscyamus muticus* L.; egyptian henban; callus formation; *in vitro* culture; explant; secondary metabolites; auxin; cytokinin; benzylaminopurine; naphthylacetic acid; segments of leaf, stem, root; Murashige and Skoog medium.

УДК 58.006

Статья поступила в редакцию 30.03.2018

ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ ЦЕНОПОПУЛЯЦИЙ *ADENOPHORA LILIFOLIA* (L.) A. DC. НА ОСОБО ОХРАНЯЕМЫХ ПРИРОДНЫХ ТЕРРИТОРИЯХ СРЕДНЕГО ПОВОЛЖЬЯ И ЮЖНОГО УРАЛА

© 2018

Абрамова Лариса Михайловна, доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией дикорастущей флоры и интродукции травянистых растений
Андреева Ирина Закиевна, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник
лаборатории дикорастущей флоры и интродукции травянистых растений
Южно-Уральский ботанический сад-институт Уфимского федерального исследовательского центра РАН
(г. Уфа, Российская Федерация)

Ильина Валентина Николаевна, кандидат биологических наук,
доцент кафедры биологии, экологии и методики обучения
Самарский государственный социально-педагогический университет (г. Самара, Российская Федерация)

Аннотация. Исследование редких растений на уровне ценопопуляций на протяжении всего ареала в значительной мере способствует выявлению особенностей их биологии и экологии. Нами осуществлялось вы-

Самарский научный вестник. 2018. Т. 7, № 3 (24)