

ОПТИМИЗАЦИЯ ГОРМОНАЛЬНОГО СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ИНДУКЦИИ КАЛЛУСООБРАЗОВАНИЯ В КУЛЬТУРЕ БЕЛЕНЬ ЕГИПЕТСКОЙ IN VITRO

OPTIMIZATION OF THE HORMONAL COMPOSITION OF THE NUTRIENT MEDIUM FOR CALLUS INDUCTION FORM EGYPTIAN HENBANE PLANTS IN VITRO

**Abdelazeez Walla Mohamed Abdelmaksood
L. Khusnetdinova
O. Timofeeva**

Summary. The present study aims to develop an efficient protocol for in vitro callus production, from Egyptian henbane plants using different explants using Murashige and Skoog medium supplemented with different concentrations and combinations of kinetin and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Results showed that the callus formation depending not only on the concentration and combination of plant growth regulator but also on the type of used explant. The maximum frequency of callus formation was detected using root explants on a modified Murashige and Skoog medium supplemented with 0.5 mg / l of kinetin in combination with 0.5 mg / l of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid after two months.

Keywords: Egyptian henbane, *Hyoscyamus muticus* L., callus formation, in vitro culture, explant, auxin, cytokinin, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, kinetin, callus culture, Murashige and Skoog medium.

Абделаазиз Валла Мохамед Абделмаксуд

Аспирант, Казанский федеральный университет
wallamohamed68@gmail.com

Хуснетдинова Ландыш Завдетовна

К.б.н., доцент, Казанский федеральный университет

Тимофеева Ольга Арнольдовна

Д.б.н., профессор, Казанский федеральный университет

Аннотация. Исследованы особенности каллусообразования в культуре *Hyoscyamus muticus* L. *in vitro* из разных типов эксплантов на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга, дополненной кинетином и 2,4-дихлорфеноксисукусной кислотой. Установлено, что частота каллусообразования зависела от концентрации и соотношения регуляторов роста в питательной среде, а также типа, используемого экспланта. Максимальная частота каллусообразования обнаруживалась при культивировании корневых эксплантов на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга, содержащей 0,5 мг/л кинетина в сочетании с 0,5 мг/л 2,4-дихлорфеноксисукусной кислотой через два месяца.

Ключевые слова: Белена египетская, *Hyoscyamus muticus* L., каллусообразование, культура *in vitro*, эксплант, ауксин, цитокинин, 2,4-дихлорфеноксисукусная кислота, кинетин, среда Мурасиге и Скуга.

Введение

Биотехнологический подход обладает рядом преимуществ перед традиционными методами сохранения видов, находящихся под угрозой исчезновения: нет необходимости в больших площадях, занятых маточными и размножаемыми растениями, в регулярном уходе за посадками, исключаются болезни растений и, как следствие, потеря материала [1,2]. Так же этот подход позволяет осуществлять восстановление численности охраняемых таксонов путем создания искусственных популяций на территории природного ареала (репатриация) [3].

Одним из наиболее привлекательных преимуществ сохранения растений *in vitro* является возможность получения стерильных культур видов (редких, эндемичных) без изъятия из природных местообитаний, что позволяет предотвратить разрушение фитоценозов [1, 4].

Задачей наших исследований является разработка и оптимизация способа получения каллусной культуры белены египетской (*Hyoscyamus muticus* L.) из разных типов эксплантов при использовании среды Мурасиге и Скуга (МС), дополненной разными концентрациями кинетина (КН) и 2,4-дихлорфеноксисукусной кислотой (2,4-Д).

Материалы и методика исследований

Семена растений *H. muticus* стерилизуют в 1,5% растворе NaOCl и проращивают *in vitro* на свету в течение 30–45 суток [5,6]. Полученные проростки рассекают на сегменты размером 1,0 см, переносят на модифицированную питательную среду, составленную по прописи МС [7] включающую КН и 2,4-Д.

В качестве инициальных эксплантов используют листья, стебли и корни, полученные в культуре *in vitro* из семян. При введении в культуру применяют стандартные ме-

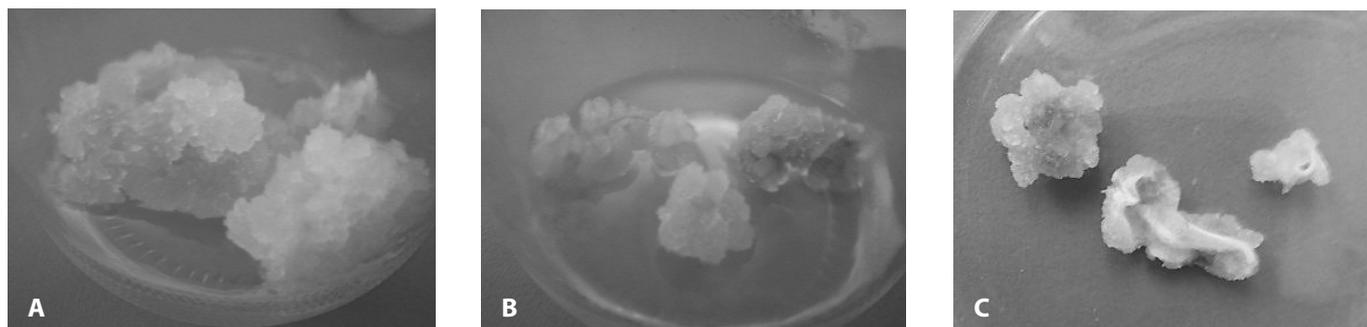


Рис. 1. Каллусообразование на питательной среде Мурасиге и Скуга: А — каллусообразование из листовых эксплантов на среде МС, дополненной 0,5 мг/л КН в сочетании с 2,0 мг/л 2,4-Д; В — каллусообразование из стеблевых эксплантов на среде МС, дополненной 1,0 мг/л КН в сочетании с 0,5 мг/л 2,4-Д; С — каллусообразование из корневых эксплантов на среде МС, дополненной 1,0 мг/л КН в сочетании с 0,5 мг/л 2,4-Д

тодики, принятые в работах по биотехнологии [8]. В ходе проведения эксперимента нами было опробовано десять различных модификаций стандартной среды Мурасиге и Скуга [9], характеризующихся различным уровнем содержания регуляторов роста: среда МС с добавлением КН в концентрации (1,0; 2,0 и 3,0 мг/л); 0,5 мг/л КН в сочетании с 0,5; 1,0 и 2,0~<2,4-Д; 1,0 мг/л КН в сочетании с 0,5; 1,0 и 2,0~<2,4-Д. В качестве контроля во всех экспериментах служила безгормональная питательная среда. Экспланты культивируют при комнатной температуре (26 °С) на свету (фотопериод свет/темнота, 8 час/16 час) [10].

Статистическую обработку результатов и анализ полученных данных выполняли с использованием программы OriginPro 9.0. Данные представлены в виде средних значений с доверительными интервалами (mean \pm SE), статистическая значимость различий определялась по U тесту Mann Whitney ($p < 0,05$). Графики построены в программе Microsoft Excel 13.

Результаты и их обсуждение

Культивирование эксплантов на модифицированных питательных средах МС показало, что частота каллусообразования зависит от концентрации регуляторов роста (рис. 1).

При культивировании сегментов листа *H. muticus in vitro*, высокие показатели частоты каллусообразования (в пределах 100%), были отмечены на среде МС, содержащей КН в сочетании с 2,4-Д. На среде, содержащей только КН, каллусогенеза не наблюдалось. 2,4-Д, сам по себе или в сочетании с цитокининами, широко используется для усиления индукции и поддержания каллуса [11]. Более того, многие исследователи применяли 2,4-Д как лучший ауксин для индукции каллуса многих растений [12, 13, 14, 15, 16].

Максимальное каллусообразование было отмечено на питательных средах, дополненных регуляторами роста в следующих концентрациях: 1,0 мг/л КН в сочетании с 0,5 мг/л 2,4-Д (в среднем 5,89 мг/эксплант сырого каллуса и 0,28 мг/эксплант сухого каллуса).

Низкое каллусообразование наблюдали на среде МС, содержащей 0,5 мг/л КН и 0,08 мг/л 2,4-Д. В среднем сырой и сухой вес каллуса составил 1,28 и 0,67 мг/эксплант соответственно (рисунок 2).

На рисунке 3 представлены данные по каллусообразованию при культивировании стеблевых эксплантов *H. muticus* на среде МС, дополненной КН и КН в сочетании с 2,4-Д. Из представленного графика видно, что зависимость частоты каллусообразования от гормонального состава носила нелинейный характер. Однако следует отметить, что общий уровень частоты каллусообразования при культивировании на этой среде был ниже.

Индукция каллусогенеза из стеблевых эксплантов *H. muticus*, как видно из полученных данных (рис. 3), наблюдалась на среде МС, содержащей КН в сочетании с 2,4-Д. Максимальное каллусообразование было обнаружено при применении концентрации 1,0 мг/л КН в сочетании с 1,0 мг/л 2,4-Д (в среднем 3,37 мг/эксплант сырого каллуса и 0,012 мг/эксплант сухого каллуса) через два месяца. Не наблюдалось образование каллуса на среде, содержащей 1,0 мг/л КН в сочетании с 0,5 мг/л 2,4-Д, а также на среде, дополненной только КН, и в контрольном варианте. Низкие показатели образования каллуса из стеблевых эксплантов *H. muticus* были отмечены на среде МС с 1,0 мг/л КН в сочетании с 2,0 мг/л 2,4-Д. В среднем сырой и сухой вес каллуса составил 0,74 и 0,018 мг/эксплант соответственно.

Индукция каллусогенеза из корневых эксплантов *H. muticus* наблюдалась на среде, содержащей только КН

и КН в сочетании с 2,4-Д, тогда как на безгормональной среде каллус не образовывался (рис. 4). Низкие показатели каллусообразования из корневых эксплантов выявлены на среде МС, содержащей 2,0 мг/л КН (в среднем 0,04 мг/эксплант сырого каллуса и 0,01 мг/эксплант сухого каллуса). Максимальное каллусообразование отмечалось при концентрации 0,5 мг/л КН в сочетании с 0,5 мг/л 2,4-Д (в среднем 6,76 мг/эксплант сырого каллуса и 0,22 мг/эксплант сухого каллуса) через два месяца.

Таким образом, проведенные нами исследования показали возможность получения каллусных культур из разных типов эксплантов *H. muticus* на среде МС с добавлением КН и 2,4-Д в широком диапазоне концентраций. Полученные данные подтверждают тот факт, что в культуре *in vitro* определяющим фактором, влияющим на способность эксплантов к каллусообразованию, является наличие в питательной среде регуляторов роста, а минеральный и органический состав среды культивирования имеет второстепенное значение [17, 18].

Высокие показатели частоты каллусообразования наблюдались только при определенных соотношениях концентраций регуляторов роста [19]. Так, максимальная частота каллусообразования была выявлена на модификациях питательных сред с низким соотношением КН в сочетании с 2,4-Д из корневых эксплантов *H. muticus*. При увеличении этого отношения показатель частоты каллусообразования был значительно ниже. Аналогичная закономерность была показана ранее и для других видов растений [20, 21]. Полученные нами данные по влиянию регуляторов роста на каллусообразование у белены египетской отличаются от результатов исследователей, согласно которым лучшая индукция каллуса у *Origanum vulgare* и *Origanum syriacum* была отмечена на среде МС с добавлением 0,1 или 0,5 мг/л 2,4-Д [22]. Введение в питательную среду 0,5 мг/л 2,4-Д, по данным иракских ученых, также способствовало интенсивному каллусообразованию, а максимального значения масса формирующегося каллуса достигала на среде, содержащей 2,4-Д и БАП [23]. Также эффективная индукция каллуса наблюдалась у *Solanum tuberosum* при введении в среду 2,4-Д и БАП [24, 25].

Выводы

1. Основным фактором, влияющим на частоту каллусообразования в культуре *H. muticus in vitro*, является содержание в питательной среде гормональных индукторов.
2. Максимальное каллусообразование наблюдалась при культивировании корневых эксплантов *H. muticus* на модифицированной питательной среде МС дополненной 0,5 мг/л КН в сочетании с 0,5 мг/л 2,4-Д.

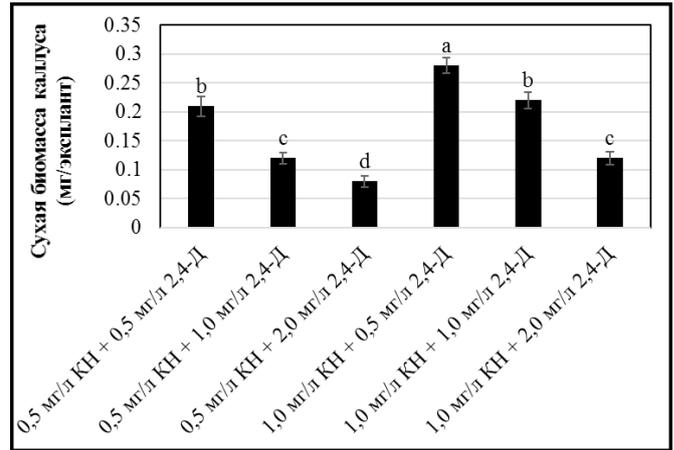


Рис. 2. Влияние КН и 2,4-Д на индукцию каллуса из листовых эксплантов *H. muticus* (mean±SE, n=5)

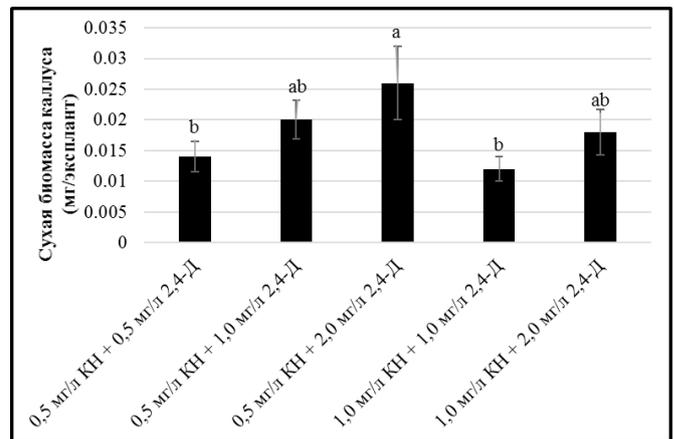


Рис. 3. Влияние КН и 2,4-Д на индукцию каллуса из стеблевых эксплантов *H. muticus* (mean±SE, n=5)

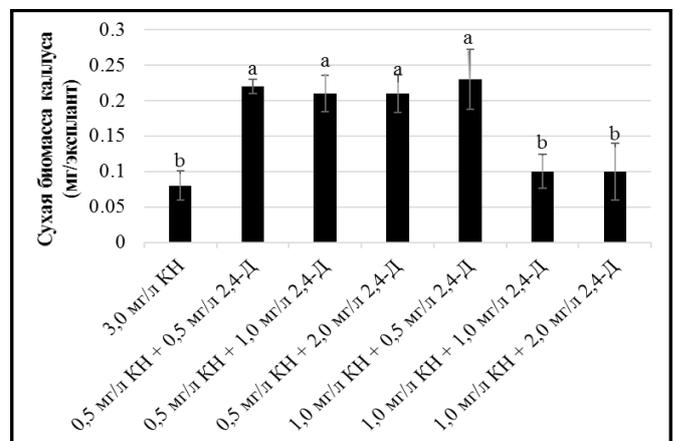


Рис. 4. Влияние КН и 2,4-Д на индукцию каллуса из корневых эксплантов *H. muticus* (mean±SE, n=5)

ЛИТЕРАТУРА

1. Reed B.M., Sarasan V., Kane M., Bunn E., Pence V. C. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools // *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 2011. Vol. 47. P. 1–4.
2. Krishnan P.N., Decruse S. W., Radha R. K. Conservation of Medicinal Plants of Western Ghats, India and its Sustainable Utilization Through in vitro Technology // *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 2011. Vol. 47. P. 110–122.
3. Tandon P., Kumaria S. Prospects of plant conservation biotechnology in India with special reference to northeastern region Biodiversity. New Delhi, India: Norasa Publishing House, 2005.
4. Leung D.W.M. Plant biotechnology helps quest for sustainability: With emphasis on climate change and endangered plants // *Climate change and sustainable development* (Ed. R. Reck). Louisville: Linton Atlantic Books, 2010. P. 247–250.
5. Elmaksood W.M.A, Ebad F. A., Bosila H. A. In vitro Propagation of the Endangered Medicinal Plant *Hyoscyamus muticus* L. (Egyptian henbane) // *J. Appl. Environ. Biol. Sci*. 2016. Vol. 6(4). P. 25–34.
6. 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.
7. Виестур У.Э., Шмите И. А., Жилевич А. В. Биотехнология. Биологические агенты, технология, аппаратура. Рига: Зинатне, 1987.
8. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами // ГНУ ВНИИСПК; авт.-сост.: Е. Н. Джигадло, М. И. Джигадло, Л. В. Голышкина; под ред. Е. Н. Джигадло. — Орел: ГНУ ВНИИСПК, 2005.
9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant*. 1962. Vol. 15(13). P. 473–497.
10. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев: Наук. думка, 1980.
11. Castillo A.M., Egana B., Sanz J. M., Cistue L. Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grown in Spain // *Plant Cell Rep*. 1998. Vol. 17. P. 902–906.
12. Evans D.A., Sharp W. R., Filck C. E. Growth and behavior of cell culture: embryogenesis and organogenesis In *Plant Tissue Culture: Method and applications in Agriculture* // Thrope TA (Ed) Academic press. 1981. P. 45–113.
13. Ho W.O., Vasil I. K. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) the morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos // *Protoplasma*. 1983. Vol. 118. P. 169–180.
14. Jaiswal V.S., Naryan P. Regeneration of plantlets from the callus of stem segment of adult plants of *Fucus religiosa* L. // *Plant Cell Reports*. 1985. Vol. 4. P. 256–258.
15. Chee P. P. High frequency of somatic embryogenesis and recovery of fertile cucumber plants // *Hort. Sci*. 1990. Vol. 25. P. 792–793.
16. Mamun A.N.K., Islam R., Reza M. A., Joadar O. I. In vitro differentiation of plantlet of tissue culture of *Samanea saman* // *Plant Tissue Cult*. 1996. Vol. 6. P. 1–5.
17. Кунах В. А. Биотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. К.: Логос, 2005.
18. Гамбург К.З., Рекославская Н. И., Швецов С. Г. Ауксины в культурах клеток и тканей растений. Новосибирск: «Наука. Сиб. отд-ние», 1990.
19. Chawla H.S., Anju A. Organogenic plant regeneration via callus induction in chickpea (*Cicer arietinum* L.) — Role of genotypes, growth regulators and explants // *Indian Journal of Biotechnology*. 2005. Vol. 4. P. 251–256.
20. Биология клеток растений in vitro и биотехнология: IX Международная конференция, Звенигород, 8–12 сентября 2008 г. / М.: ИД ФБК-ПРЕСС, 2008.
21. Kumari N. Regeneration of plants from callus culture of *Origanum vulgare* L. // *Plant Cell Rep*. 1992. Vol. 11. P. 476–479.
22. Rami M. Arafah, Rida A. Shibli, Mohsen AlMahmoud, Mohamad A. Shatnawi. Callusing, cell suspension culture and secondary metabolites production in persian oregano (*Origanum vulgare* L.) and arabian oregano (*O. syriacum* L.) // *Jordan Journal of Agricultural Sciences*. 2006. Vol. 2(3). P. 274–287.
23. Abedaljasim M.J.A., Ashwaq S. A., Duha M. M., Eman N. I. Influence of abiotic elicitors on accumulation of thymol in callus cultures of *Origanum vulgare* L. // *Journal of Life Sciences*. 2012. Vol. 6. P. 1094–1099.
24. 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.
25. Nistor A., Campeanu G. H., Nicoleta Chiru, Diana K. C. Effect of auxin and cytokinin on callus induction in potato (*Solanum tuberosum* L.) explants // *Agricultura Stiinta si practica*. 2009. Vol. 12(69–70). P. 47–50.

© Абделаиз Валла Мохамед Абделмаксуд (wallamohamed68@gmail.com), Хуснетдинова Ландыш Завдетовна,
Тимофеева Ольга Арнольдовна.

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»