

ВЛИЯНИЕ ТИПА ЭКСПЛАНТА И РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА РАСТЕНИЙ НА КАЛЛУСОГЕНЕЗ И НАКОПЛЕНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ *VACCINIUM CORYMBOSUM* L. СОРТА БЛЮ БЕРРИ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO¹

Мохамед Гамил Райян Абуэлдис

Аспирант, Казанский (Приволжский) федеральный университет
Gamil.rayan306@gmail.com

Хуснетдинова Ландыш Завдетовна

Доцент, Казанский (Приволжский) федеральный университет
Husnetdinova.l@mail.ru

Тимофеева Ольга Арнольдовна

Профессор, Казанский (Приволжский) федеральный университет
Olga.timofeeva@kpfu.ru

EFFECT OF EXPLANT TYPE AND PLANT GROWTH REGULATORS ON CALLUS INDUCTION AND ACCUMULATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN *VACCINIUM CORYMBOSUM* L. CV. BLUE-BERRY IN VITRO

**Mohamed Gmail Rayan Aboueldis
L. Khusnetdinova
O. Timofeeva**

Summary. The present study aims to the production of phenolic compounds from callus culture of *Vaccinium corymbosum* L., the results showed that, callus induction depending on the source of the explant (leaf, root, and stem segments). The optimum composition of the nutrient media were selected for obtaining a high frequency of callus formation. It was shown that the process of callus induction depended on the composition of the nutrient medium and type of explant. The highest frequency of callus formation were established on a nutrient medium containing 1.0 mg/l NAA in combination with 0.5 mg/l Kin. The fresh weight for leaf, root and stem segment explants were recorded (0.91; 0.89 and 0.66 mg/explant). The maximum content of phenolic compounds were recorded in the callus of root-origin.

Keywords: *Vaccinium corymbosum* L., Highbush Blueberry, callus formation, in vitro culture, explant, callusgenesis induction, WPM medium, phenolic compounds.

Аннотация. Исследованы особенности индукции каллусогенеза и содержание фенольных соединений в культуре *Vaccinium corymbosum* L. в зависимости от источника экспланта (лист, корень, стебель). Подобран оптимальный состав питательных сред для получения высокой частоты каллусообразования. Показано, что процесс индукции каллусогенеза зависел от состава питательной среды и типа, используемого экспланта. Высокая частота каллусообразования была установлена на питательной среде, содержащей 1 мг/л НУК в сочетании с 0,5 мг/л Кин. Для листовых, корневых и стеблевых эксплантов она составила 0,91; 0,89 и 0,66 мг/эксплант. Установлено, что содержание фенольных соединений было максимальным в каллусе корневого происхождения.

Ключевые слова: *Vaccinium corymbosum* L., голубика высокорослая, каллусообразование, культура in vitro, эксплант, индукция каллусогенеза, среда WPM, фенольные соединения.

Введение

Vaccinium corymbosum L. вид листопадных кустарничков из семейства Вересковые (*Ericaceae*) — ценная в пищевом и фармацевтическом отношении ягодная культура. Полезные свойства голубики не только издавна знакомы народным лекарям, но также признаны современной официальной медициной [1]. Голубика имеет много преимуществ и обладает ан-

тимикробным, противовирусным, противоопухолевым действием, полезна при диабете, фиброзе печени, эффективна при профилактике сердечно-сосудистых заболеваний. Вещества, содержащиеся в ягодах, помогают предупреждать развитие болезни Альцгеймера, способствуя улучшению передачи сигналов в клетках головного мозга, таким образом, предотвращая умственную недостаточность, имеют омолаживающие свойства, из-за стабилизации клеточной мембраны [2]. В настоящее время

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Республики Татарстан в рамках научного проекта № 18-44-160015

мя во всем мире интерес к укрепляющим здоровье свойствам голубики объясняется высокой антиоксидантной способностью ее полифенолов [3, 4]. Использование каллусных культур растений в качестве источника ценных метаболитов может стать реальной альтернативой применения интактным растениям, что обусловлено, в первую очередь, экологичностью такого производства, не зависимостью культивирования от климатических условий и вредителей, автоматизацией производственного процесса [5]. Исходя из вышесказанного, целью исследования являлось влияние типа экспланта и регуляторов роста растений на каллусогенез и накопление фенольных соединений *V. corymbosum* сорта Блю Берри в культуре *in vitro*.

Материалы и методика исследований

В качестве исходного растительного материала для получения каллуса использовали растения-регенеранты, выращенные в культуре *in vitro* путем клонального микроразмножения [6, 7]. В качестве инициальных эксплантов использовали листья, стебли и корни. Каллусные культуры выращивали на среде WPM содержащей 25 г/л сахарозы, 2,7 г/л фита геля, регуляторы роста — кинетин (Кин) (0,5 и 1,0 мг/л) в сочетании с нафтилуксусной кислотой (НУК) в концентрациях 1,0 и 2,0 мг/л, рН-5,0. В качестве контроля во всех экспериментах служила безгормональная питательная среда. Экспланты культивировали в банках объемом 150 мл в темноте при температуре 26–28 °С и относительной влажности воздуха 70% в течение 12 недель. При исследовании особенностей каллусообразования определяли структуру каллуса, каллусообразование (%), индекс роста, удельную скорость роста, прирост сырой и сухой биомассы (мг).

Каллусообразование в процентах (X) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{\text{Количество эксплантов продуцирующих каллус}}{\text{Общее количество высаженных эксплантов}} \times 100$$

Анализ прироста биомассы проводили через каждые 4 недели в течение 4 последовательных пассажей. Индекс роста определяли после четвертого пассажа по формуле:

$$I = \frac{(M_{\max} - M_0)}{M_0}$$

где M_0 — исходная масса каллуса (мг); M_{\max} — масса каллуса в конце цикла выращивания (мг).

Удельная скорость роста определяли согласно выражению:

$$V = \frac{M_t - M_0}{\Delta t \cdot M_0}$$

где M_0 — начальная масса каллуса (мг); M_t — масса каллуса в конце цикла выращивания (мг); t — продолжительность культивирования, сут. [8].

Определение суммарного содержания растворимых фенольных соединений в каллусах проводили по методу Фолина-Чокальтеу и выражали в мг/г сухой массы в эквиваленте эпикатехина [9].

Статистическую обработку результатов и анализ полученных данных выполняли с использованием программы OriginPro 9.0. Данные представлены в виде средних значений с доверительными интервалами ($\text{mean} \pm \text{SE}$), статистическая значимость различий определялась по U тесту Mann Whitney ($p < 0,05$). Графики построены в программе Microsoft Excel 13. Опыты проводились в пяти повторностях по 15 эксплантов на вариант.

Результаты исследований и их обсуждение

Известно, что получение биомассы каллусной ткани зависит от типа экспланта и условий культивирования *in vitro* [10]. Каллус, индуцированный из листовых эксплантов, имел желтоватую окраску, характеризовался рыхлой структурой и невысокой интенсивностью роста. Каллусы, полученные из сегментов стебля и корня, имели молочный цвет и консистенцию от плотной до среднеплотной (рисунок 1).

На средах с ауксинами и цитокининами у всех эксплантов различного типа наблюдалось образование каллуса (100%) с разной интенсивностью роста. Отсутствие роста каллуса было отмечено на среде, содержащий только ауксин или только цитокинин. Максимальное каллусообразование было получено на питательной среде с 1 мг/л НУК в сочетании с 0,5 мг/л Кин для всех исследованных эксплантов. Сырая биомасса каллуса, полученная из сегментов листа, корня и стебля составила 0,91; 0,89 и 0,66 мг/эксплант. Так как низкое каллусообразование было характерно для сегментов стебля, поэтому для дальнейших исследований его не использовали (рисунок 2).

Для получения первичного каллуса из сегментов листьев и корней *V. corymbosum* сорта Блю Берри, экспланты культивировали в течение 12 недель на среде WPM с добавлением 1 мг/л НУК и 0,5 мг/л Кин с последующим пассированием каллуса в течение 4 последовательных пассажей на той же среде. На I-ом пассаже биомасса каллуса из листьев и корней увеличилась в 2,5 и 2,2 раза от начальной биомассы каллуса

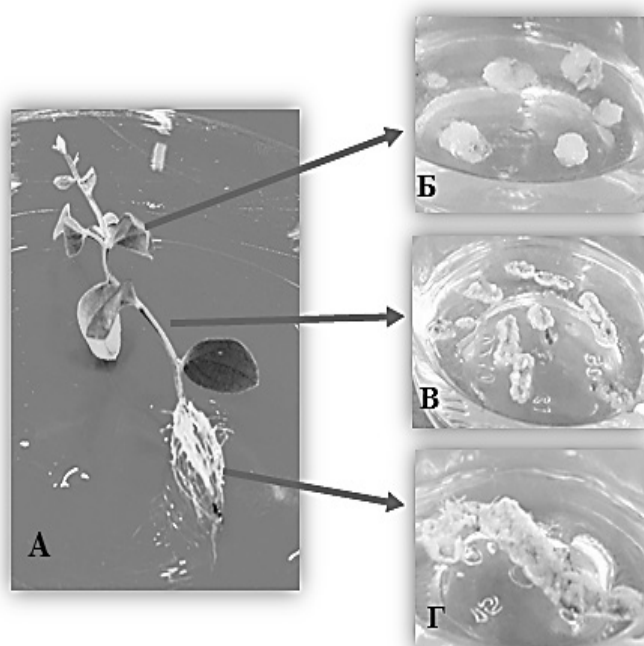


Рис. 1. Начальные этапы каллусообразования из разных типов эксплантов: А — исходный материал, Б — листовые экспланты, В — стеблевые экспланты, Г — корневые экспланты

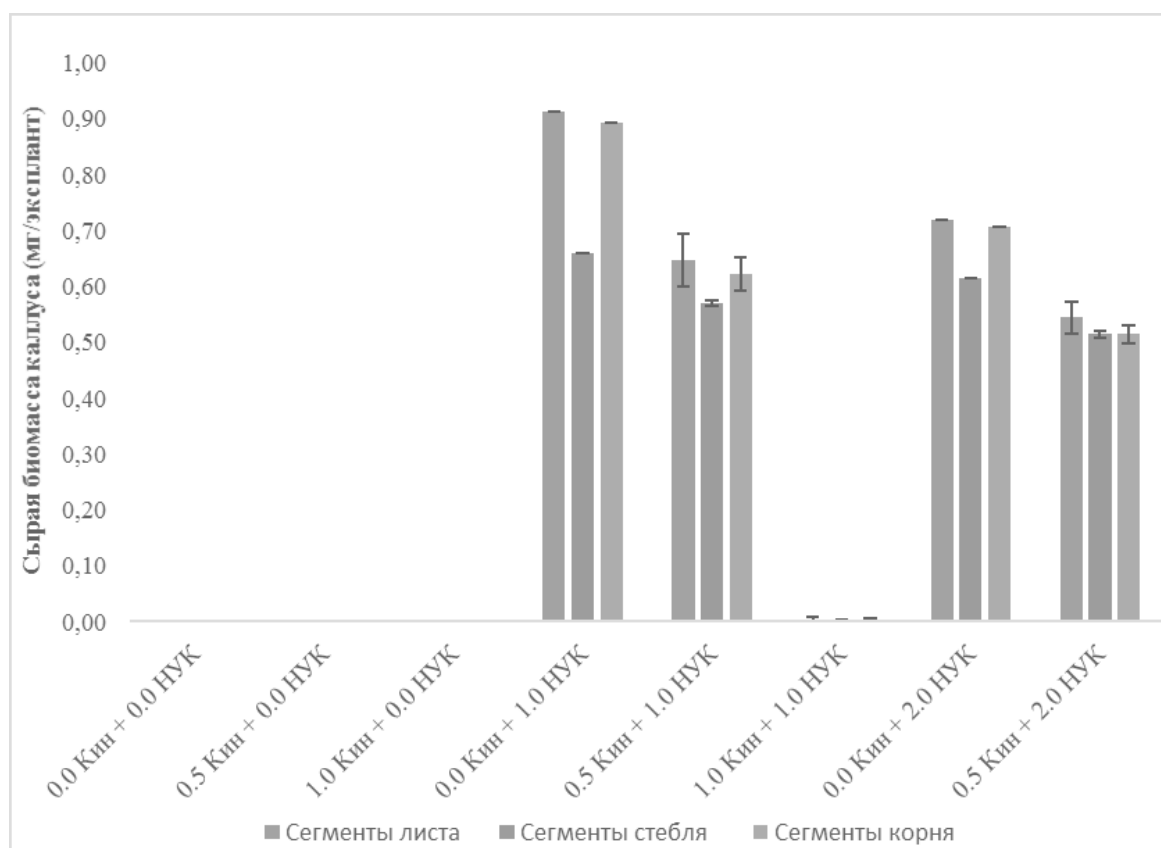


Рис. 2. Влияние Кин и НУК на каллусообразование *V. corymbosum* сорта Блю Берри

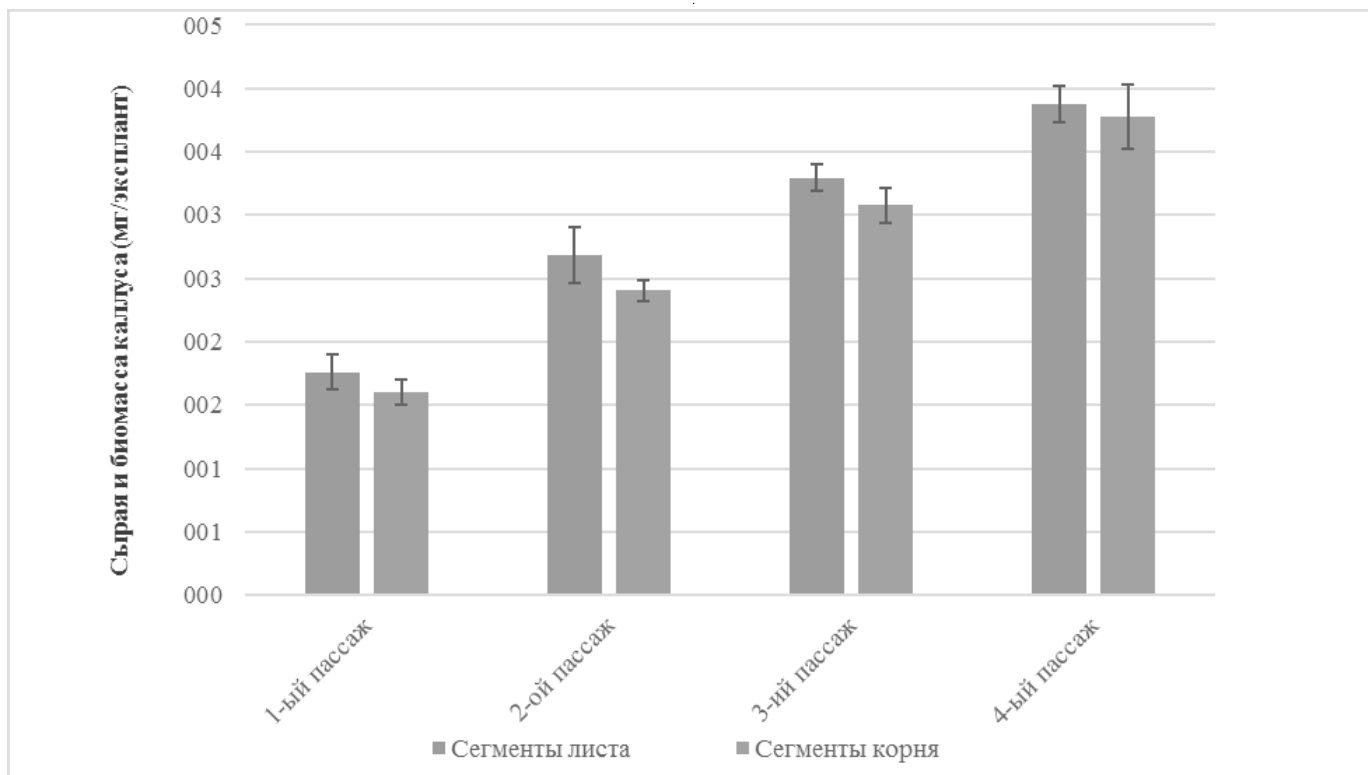


Рис. 3. Влияние Кин и НУК на каллусообразование *V. corymbosum* сорта Блю Берри в течение 4 последовательных пассажей

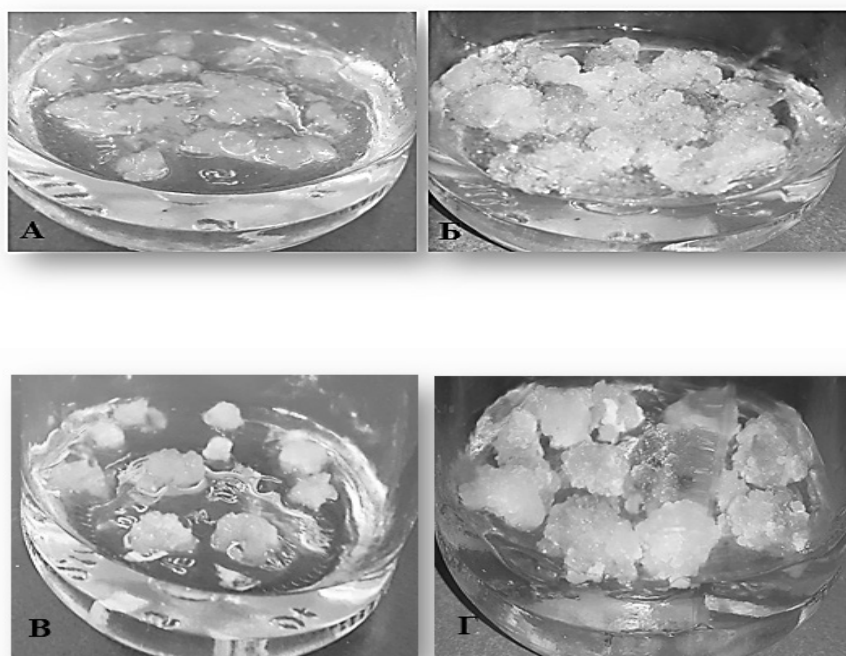


Рис. 4. Влияние Кин и НУК на каллусообразование *V. corymbosum* сорта Блю Берри: А — каллус листового происхождения в начале IV-го пассажа, Б — масса каллуса листового происхождения в конце IV-го пассажа; В — масса каллуса корневого происхождения в начале IV-го пассажа; Б — масса каллуса корневого происхождения в конце IV-го пассажа

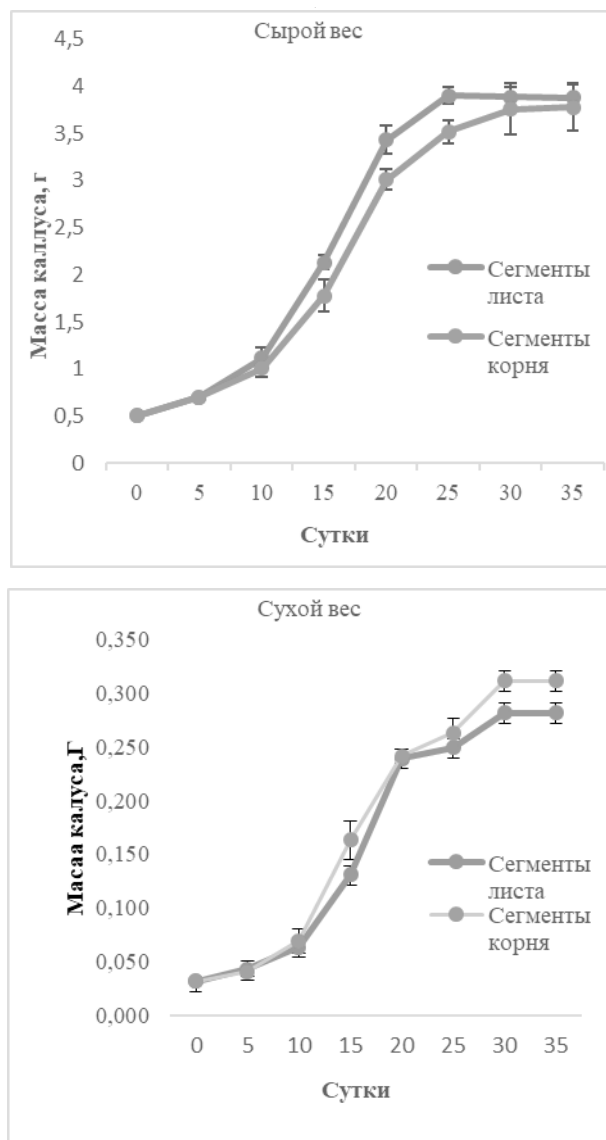


Рис. 5. Динамика роста каллуса листового и корневого происхождения *V. corymbosum* сорта Блю Берри в течение 35 суток

(0,5 г), на II-ом пассаже в 4,4 и 3,8 раза, на III-ем пассаже в 5,6 и 5,2 раза, на IV-ом пассаже в 6,8 и 6,6 раза (рисунок 3, 4).

Одной из важнейших характеристик роста каллусных культур, позволяющих оценить активность ростовых процессов на разных этапах выращивания и определить ее оптимальную продолжительность, является кривая ростового цикла. Как видно на рисунке 5, с 5-х суток наблюдалось повышение ростовой активности культуры, что свидетельствовало о переходе в логарифмическую фазу роста, продолжающуюся вплоть до 20-х суток, после чего рост каллусных культур замедлялся. После фазы замедления роста, продолжавшейся в течение 5-х суток, следовала стационарная фаза, где изменения массы кле-

ток были незначительными продолжаясь вплоть до 35-х суток. Следует отметить, что несмотря на то, что в каллусах из корневых эксплантов, сырая масса была ниже по сравнению с каллусами листового происхождения, прирост сухой биомассы в каллусах корневого происхождения был выше, чем в листовых. По-видимому, это связано с разной степенью оводненности каллусных клеток.

Индекс роста сырой биомассы из листовых и корневых эксплантов составил 6,67 и 6,39 соответственно, сухой массы — 7,90 и 8,88.

Удельная скорость роста сырой биомассы каллуса из листовых эксплантов была $0,267 \mu, \text{сут}^{-1}$ из кор-

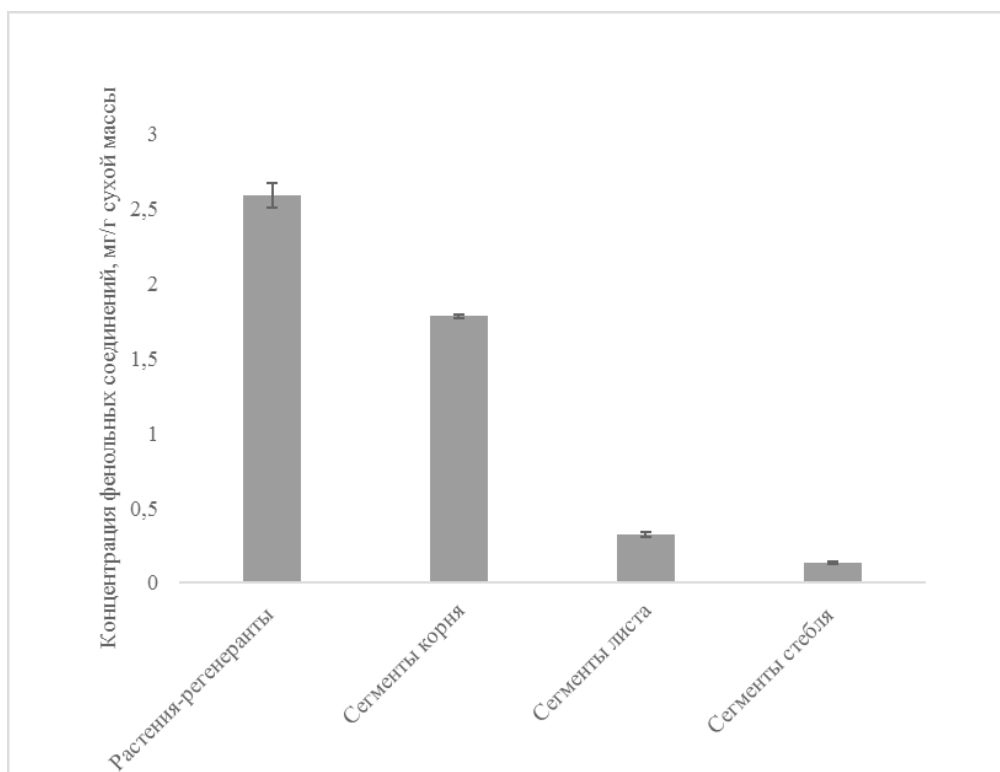


Рис. 6. Динамика накопления фенольных соединений каллусными культурами *V. corymbosum* сорта Блю Берри

невых — 0,197 μ , сут⁻¹, удельная скорость роста сухой биомассы — 0,230 и 0,241 μ , сут⁻¹ для каллусов из листовых и корневых эксплантов соответственно. В течение 35 суток культивирования фазы деградации отмечено не было.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод, что регулярные пересадки каллусной культуры *V. corymbosum* сорта Блю Берри на свежую питательную среду необходимо производить каждые 25–30 суток.

На следующем этапе исследований изучали накопление фенольных соединений в каллусных культурах *V. corymbosum* сорта Блю Берри. Исследования проводили на каллусных культурах, находящихся на стационарной фазе роста (25–35 дней для каллуса листового происхождения и 30–35 дней для каллуса корневого происхождения). Было показано, что содержание фенольных соединений в каллусах листового и корневого происхождения постепенно увеличивалось в процессе культивирования, достигая максимума на стационарной фазе роста [11, 12, 13]. Как правило, накопление вторичных метаболитов наблюдается после прекращения роста клеток, на поздней экспоненциальной и стационарной фазах роста.

Как видно из рисунка 6, содержание фенольных соединений в каллусе стеблевого происхождения составило 0,13 мг/г сухой массы, листового происхождения — 0,32 мг/г сухой массы и корневого происхождения содержание — 1,78 мг/г сухой массы. В растении-регенеранте содержание фенольных соединений было 2,6 мг/г сухой массы.

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что для получения быстрорастущего каллуса лучше использовать листовые экспланты. Однако для производства фенольных соединений более перспективными являются каллусы корневого происхождения, что еще раз свидетельствуют о тотипотентности растительных клеток в культуре *in vitro*.

ВЫВОДЫ

В результате наших исследований было показано, что на каллусообразование *V. corymbosum* сорта Блю Берри оказывают влияние тип экспланта, концентрации и соотношения регуляторов роста в питательной среде. Определены подходящие концентрации регуляторов роста растений для создания каллусной культуры для производства ценных лекарственных соединений растительного происхождения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nestby R. The European blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and the potential for cultivation / R. Nestby, D. Percival, I. Martinussen, N. Opstad and J. Rohloff // *European Journal of Plant Science and Biotechnology*. — 2011. — V. (5). — P. 5–16.
2. Kalt W. Blueberries and human health: a review of current research/W. Kalt, J. A. Joseph, B. Shukitt-Hale// *Journal of the American Pomological Society*. — 2007. — V. 61(3). — P. 151.
3. Colak N. Comparison of phenolics and phenolic acid profiles in conjunction with oxygen radical absorbing capacity (ORAC) in berries of *Vaccinium arctostaphylos* L. and *V. myrtillus* L / N. Colak, H. Torun, J. Gruz, M. Strnad, M. Subrtova, H. Inceer and F. A. Ayaz // *Polish journal of food and nutrition sciences*. — 2016. — V. 66(2). — P. 85–92.
4. Naczka M. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis / M. Naczka and F. Shahidi // *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. — 2006. — V. 41(5). — P. 1523–1542.
5. Hussain M. S. Current approaches toward production of secondary plant metabolites / M. S. Hussain, S. Fareed, M. Saba Ansari, A. Rahman, I. Z. Ahmad and M. Saeed // *Journal of pharmacy & bioallied sciences*. — 2012. — V. 4(1). — P. 10.
6. Мохамед Г.Р.А. Укоренение микрочеренков *Vaccinium corymbosum* L. сорта Блю Берри в культуре *in vitro* и *ex vitro* / Г.Р.А. Мохамед, Л. З. Хуснетдинова, О. А. Тимофеева // *Самарский научный вестник*. — 2018. — Т. 7. — № 4(25). — С. 80–84.
7. Mohamed G.R.A. Elaboration of Micropropagation Protocol for *Vaccinium corymbosum* cv. «Sunt Blue Giant» / G.R.A. Mohamed, L. Z. Khusnetdinova, O. A. Timofeeva // *Asian Journal of Plant Science and Research*. — 2018. — V. 8(5). — P. 1–11.
8. Эрст А. А. Особенности каллусообразования экдистероид-содержащих видов рода *Silene* L. (Caryophyllaceae Juss) в культуре *in vitro* / А. А. Эрст, Л. Н. Зибарева // *Сибирский экологический журнал*. — 2013. — Т. 20, № 4. — С. 603–608.
9. Запрометов М. Н. Фенольные соединения и методы их исследования / М. Н. Запрометов // *Биохимические методы в физиологии растений* / Под. Ред. Павлиновой О. А. М.: Наука — 1971. — С. 185–197.
10. Adil M. Effect of explant type and plant growth regulators on callus induction, growth and secondary metabolites production in *Cnidium officinale* Makino / M. Adil, X. Ren, D. I. Kang, and B. R. Jeong // *Molecular biology reports*. — 2018. — V. 45(6). — P. 1919–1927.
11. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая and В. Е. Полищук // *Наукова думка*. — 1980. 488.
12. Логвина А. О. Динамика накопления фенольных соединений и сапонинов каллусными культурами пажитника греческого в ходе ростового цикла / А. О. Логвина, Д. Ю. Глушакова, Т. И. Дитченко и В. М. Юрин // *Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География*. — 2014. — № 1. — С. 27–31.
13. Березина Е. В. Содержание полифенолов в каллусных культурах клюквы болотной при модификации питательной среды цитокининами и препаратами микромицетов / Е. В. Березина, М. Н. Агеева, А. А. Брилкина и А. П. Веселов // *Вестник защиты растений*. — 2016. — № 89(3) — С. 26–27.

© Мохамед Гамил Райян Абуэлдис (Gamil.rayan306@gmail.com),

Хуснетдинова Ландыш Завдетовна (Husnetdinova.l@mail.ru), Тимофеева Ольга Арнольдовна (Olga.timofeeva@kpfu.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Казанский федеральный университет