

ВЛИЯНИЕ ГОРМОНАЛЬНОГО СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ И ЭНДОГЕННЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ *IPOMOEA BATATAS* (L.)

Е.А. Калашникова

д.б.н., профессор, кафедра биотехнологии,
Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева (Москва, Россия)
E-mail: kalash0407@mail.ru

Р.Н. Киракосян

к.б.н., доцент, кафедра биотехнологии,
Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева (Москва, Россия)
E-mail: mia41291@mail.ru

Х.Г. Абубакаров

аспирант, кафедра биотехнологии,
Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева (Москва, Россия)
E-mail: khrpo95@mail.ru

С.М. Зайцева

к.б.н., доцент, кафедра биотехнологии,
Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева (Москва, Россия)
E-mail: smzaytseva@yandex.ru

Актуальность. *Ipomoea batatas* (L.) – ценная сельскохозяйственная культура, в клубнеплодах которой накапливается инулин, природный полисахарид, не имеющий синтетических аналогов. В производстве функциональных продуктов питания российские производители, как правило, используют импортный инулин. Глобализация, информационная революция, а также санкционная политика обострили существенные проблемы мировой экономики, что повышает актуальность импортозамещения ряда товаров и продуктов. Известно, что холодовой стресс является одним из основных факторов окружающей среды, ограничивающих сельскохозяйственное производство. Низкие положительные температуры негативно влияют на рост, развитие, продуктивность и урожай растений *I. batatas* (L.). Создать стрессоустойчивые растения можно с использованием методов клеточной биотехнологии, в частности, клеточной селекции *in vitro*, которая проводится на каллусной ткани, культивируемой в стрессовых условиях.

Цель исследования – оценка влияния гормонального состава питательной среды и эндогенных полифенолов на формирование каллусной ткани батата (*I. batatas* (L.)) *in vitro*.

Материал и методы. Объект исследования – три сорта *I. batatas* (L.) (Пурпл, Jewel, Порто Рико). Каллусную ткань получали из сегментов листовых пластинок и междоузлий стебля, которые изолировали из асептических растений батата. Экспланты культивировали на питательной среде МС, содержащей БАП 0,5 мг/л и 1 мг/л НУК/ ИУК/ 2,4-Д. Локализацию фенольных соединений изучали в листьях, стеблях, апикальных почках микроклонов батата, а также в каллусной ткани, полученной на питательной среде с разными ауксинами. Для этого применяли гистохимические методы: на сумму фенольных соединений материал окрашивали 0,08% раствором реактива Fast Blue, для изучения локализации флаванов (катехины и проантоцианидины) использовали реакцию с ванилиновым реактивом в парах соляной кислоты.

Результаты. Установлено, что применяемые ауксины оказывали существенное влияние на интенсивность образования каллусной ткани, ее консистенцию и цвет. Хорошо пролиферирующая каллусная ткань светло-желтого цвета получена на среде с НУК, на среде с ИУК формировалась плотная, зеленого цвета ризогенная каллусная ткань, а на среде с 2,4-Д – ткань темного цвета, которая в процессе культивирования погибала. Каллусная ткань образовывалась в тех местах, в которых образование и локализация фенольных соединений было незначительным.

Выводы. В каллусных культурах, инициированных из листовых пластинок и выращиваемых на питательной среде с НУК, содержание клеток с фенольными соединениями меньше, чем у каллуса, полученного также из листовых пластинок, но на среде с 2,4-Д.

Ключевые слова: батат, каллусная ткань, ауксины, полифенолы, *in vitro*, морфогенез.

Для цитирования: Калашникова Е.А., Киракосян Р.Н., Абубакаров Х.Г., Зайцева С.М. Влияние гормонального состава питательной среды и эндогенных полифенолов на формирование каллусной ткани *Ipomoea batatas* (L.). Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2022;25(11):46–58. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-11-08>

Главной задачей селекции является получение новых форм, гибридов и сортов сельскохозяйственных растений, обладающих повышенной продуктивностью, устойчивостью к различным

абиотическим и биотическим стрессовым факторам окружающей среды, а также способностью накапливать минеральные соединения, витамины, биологически активные вещества, оказывающие благоприятное действие на организм как человека, так и животных. В последнее время особый интерес привлекают растения, способные образовывать в тканях инулин – природный полисахарид, не имеющий синтетических аналогов.

Инулин широко используют в промышленности, поскольку он обладает сливочным привкусом и может заменять жиры в молочных и хлебобулочных изделиях [1]. Из-за гликозидных связей инулин не переваривается пищеварительными ферментами животных с однокамерным желудком, однако может быть утилизирован полезными бактериями в толстой кишке. В настоящее время, благодаря биосовместимости и биоразлагаемости в организме человека, инулин и его производные широко применяются в пищевой и фармацевтической промышленности [2–5]. Инулин используют в качестве пребиотика, заменителя жира, сахара, модификатора текстуры, а также для разработки функциональных пищевых продуктов с целью улучшения работы желудочно-кишечного тракта. По литературным данным, инулин играет превентивную роль в отношении желудочно-кишечных осложнений, а также улучшает перистальтику кишечника. Кроме того, потребление инулина усиливает усвоение кальция, магния и железа и стимулирует иммунную систему [6]. Исследования *in vitro* показали, что инулин обладает способностью удалять радикалы и восстанавливать железо, хотя они слабее, чем у витамина С. Кроме того, исследования кур-несушек *in vivo* установили, что пищевые добавки с инулином значительно улучшили антиоксидантный статус этих птиц [7]. Поэтому природные источники инулина имеют большую ценность, обладая пользой для здоровья человека.

В настоящее время насчитывается более 3000 растений, в корнях или клубнях которых синтезируется и накапливается инулин [8]. Однако поиск альтернативных источников инулина остается актуальным направлением исследований. Одной из перспективных сельскохозяйственных культур, в корнеплодах которых содержится инулин, является батат (*Ipomoea batatas* (L.)). В мире существует около 6000 сортов батата, которые возделывают в разных странах [9]. Родиной батата являются Перу и Колумбия, а сегодня эту культуру выращивают в США, Израиле, Китае, Индии, Индонезии, Грузии,

странах Средней Азии и в Украине. В Российской Федерации сладкий картофель возделывают в южных районах с достаточно жарким климатом.

В отличие от основных продовольственных культур, инулинсодержащие растения в основном дают сравнительно высокий урожай в относительно теплых климатических условиях. Среди абиотических стрессов известно, что холодовой стресс является одним из основных факторов окружающей среды, ограничивающих сельскохозяйственное производство, вызывая ущерб до и после сбора урожая, что ежегодно приводит к огромным финансовым потерям в сельском хозяйстве. Холодовой стресс также оказывает огромное влияние на выживание и географическое распространение растений.

Классические методы селекции демонстрируют ограниченный успех в создании устойчивых к холоду сельскохозяйственных растений, поскольку для большинства чувствительных к холоду растений существует потребность в межвидовой или даже межродовой гибридизации. Среди методов биотехнологии, наиболее перспективных в создании новых форм растений, обладающих устойчивостью к биотическим и абиотическим стрессовым факторам окружающей среды, следует отметить клеточную инженерию, в частности, клеточную селекцию *in vitro*.

Низкие положительные температуры негативно влияют на рост, развитие, продуктивность и урожай растений *Ipomoea batatas* (L.). Это, прежде всего, связано с биологическими особенностями самого растения. Для батата критической температурой является температура 14 °С, при которой приостанавливаются все ростовые процессы, прежде всего, рост надземной части растений, а при температуре 10 °С полностью останавливается обмен веществ, что делает не целесообразным его дальнейшее выращивание в почве, так как надземная биомасса погибает. Поэтому стоит задача получения толерантных к низким положительным температурам новых форм, гибридов и сортов батата для расширения ареала возделывания данной культуры в Российской Федерации.

Работы по культивированию батата в условиях *in vitro* проводятся в различных лабораториях ряда стран Африки, Азии, Латинской Америки [10–12]. Однако результаты, полученные разными учеными, противоречивы. Кроме того, исследования направлены на оптимизацию различных этапов клонального микроразмножения данной культуры и не затрагивают вопросы получения хорошо пролифери-

рующей каллусной ткани. Данное направление исследований является крайне необходимым, так как основным объектом исследований при селекции *in vitro* является каллусная ткань. Поэтому на начальном этапе работы по селекции *in vitro* необходимо разработать протокол получения хорошо пролиферирующей каллусной ткани.



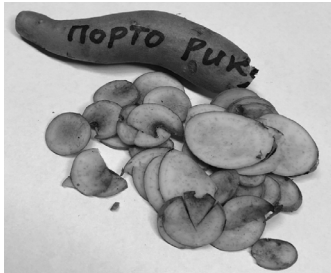
Цель исследования – оценка влияния гормонального состава питательной среды и эн-

догенных полифенолов на получение каллусной ткани батата (*Ipomoea batatas* (L.)) в культуре *in vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе исследовали три сорта овощного батата – Пурпл (фиолетовый), Порто Рико (белый), Jewel (оранжевый). Исследуемые сорта отличаются цветом мякоти и кожурой клубнеплодов, а также разными сроками созревания (табл. 1).

Таблица 1. Характеристика сортов батата, используемых в работе

Сорт	Описание сорта	Фотография сорта (автор)
<i>Овощные сорта – ранние сорта (90–100 дней)</i>		
Пурпл (Purple)	Сорт американской селекции, имеет удлиненные клубнеплоды темно-фиолетового цвета, мякоть фиолетовая с неярким белым мраморным рисунком, сухая, плотная, малосладкая. Сорт устойчив к насекомым. Сорт ранний. При термообработке цвет не изменяется, вкус напоминает лучшие сорта картофеля, с легким оттенком каштанов. Сорт считается особенно полезным для здоровья из-за большого содержания антоцианов. Этот сорт хорошо использовать при приготовлении борща	
<i>Овощные сорта – средние сорта батата (110–120 дней)</i>		
Джевел (Jewel)	Сорт привезен в Россию из США, выведен селекционерами университета Северной Каролины. Этот сорт называют еще «королевой бататов». Кожура имеет оранжевый цвет, мякоть – интенсивно-оранжевая, вкус – сладкий, консистенция – влажная. В сыром виде похож на морковь. Имеет аромат картофеля, тыквы и сливы. Каждый куст образует небольшие плети и большое количество среднеразмерных клубнеплодов. Сорт среднеранний, успевает вызревать в условиях средней полосы. Растение компактное, формирует 3-4 плети до 50 см длиной. Все клубнеплоды расположены в основание куста	
<i>Овощные сорта – среднепоздние сорта батата (120–150 суток)</i>		
Порто Рико	Сорт привезен в Россию из Португалии. Клубнеплод плотный, сильно крахмалистый, сладкий, слаболокнистый, режется очень трудно. Для сыроедения не подходит. Срок вегетации до 150 суток. В запеченном виде сладкий, очень вкусный, напоминает заварной крем. Урожайный. Листья сильно рассеченные	

Каллусную ткань получали из сегментов листовых пластинок и междоузлий стебля, которые изолировали из асептических растений батата. Первоначально микроклоны изучаемых в работе сортов батата получены на безгормональной питательной среде, содержащей 1/2 минеральных солей по прописи Мурасига и Скуга (МС), 2% сахарозы и 0,7% агара [13]; рН во всех вариантах составляла 5,8.

Для получения каллусной ткани использовали питательную среду, содержащую минеральные соли по прописи МС, а также ауксины ИУК, НУК или 2,4-Д в концентрации 1 мг/л в сочетании с БАП 0,5 мг/л. Пересадку каллусной ткани на свежую питательную среду осуществляли один раз в 4 недели. При этом учитывали: интенсивность образования каллуса, его консистенцию и цвет.

Характеризующие каллусную ткань показатели индекс роста (I) и удельную скорость роста (μ) рассчитывали по формулам (1) и (2) соответственно:

$$I = \frac{X_{\max} - X_0}{X_0} \quad (1)$$

где X_{\max} и X_0 – максимальное и начальное значения диаметра каллусной ткани соответственно, см.

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}, \quad (2)$$

где X_2 и X_1 – диаметр каллусной ткани в моменты времени t_2 и t_1 (сут) соответственно, см.

Каллусную ткань выращивали в световой комнате, при температуре 21–23 °С, 16-часовом фотопериоде и освещении белыми флуоресцентными лампами («OSRAM AG», Германия) с интенсивностью освещения 3–3,5 тыс. люкс.

Изучение локализации фенольных соединений проводили в листьях, стеблях и апикальных почках микроклонов батата, культивируемых *in vitro*, а также в каллусной ткани, полученной на разных питательных средах. Локализацию фенольных соединений определяли гистохимическими методами: на сумму фенольных соединений материал окрашивали 0,08% раствором реактива Fast Blue [14], для изучения локализации флаванов (катехины и проантоцианидины) использовали реакцию с ванилиновым реактивом в парах соляной кислоты. С целью сохранения внутриклеточного распределения фенольных соединений, все реакции проводили в неполярных растворителях. Препараты просматривали с помощью светового микроскопа («Karl Ziess»).

Исследования проводили в 2 аналитических и 15 биологических повторностях. Статистическую обработку результатов выполняли по стандартным методикам [15]. Данные в таблицах приведены в виде средней арифметической со стандартной ошибкой ($M \pm m$). Различия выборочных средних оценивали при значении доверительной вероятности 0,95.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлены некоторые закономерности в образовании каллусной ткани:

- 1) во всех вариантах пролиферацию каллусных клеток наблюдали в местах среза и повреждений;
- 2) начало каллусогенеза отмечено на 12–15-е сутки с начала культивирования;
- 3) каллусная ткань формировалась средней плотности, желто-зеленого цвета. Исключение составил сорт Пурпл, для которого характерно появление слабо выраженной антоциановой окраски каллуса (рис. 1);
- 4) формирование первичной каллусной ткани происходило из мезофилла листовой пластинки, располагающейся между центральной и боковых жилок.

Следует отметить, что образование каллусной ткани в определенных местах зависит, прежде всего, от наличия фенольных соединений и их локализации в первичных эксплантах. В научной литературе неоднократно приводятся данные о влиянии фенольных соединений на процессы каллусообразования, а также на рост клеточных культур в условиях *in vitro* [16]. Поэтому необходимо установить зависимость образования каллусной ткани от распределения фенольных соединений по всей площади листа и определить места их максимальной локализации.

Проведенные гистохимические исследования демонстрируют специфическую локализацию полифенолов в листовой пластинке. Они преимущественно располагаются в покровных и проводящих тканях, а также наблюдается их незначительное присутствие в паренхимных клетках (рис. 2).

Кроме того, локализация полифенолов наблюдается в клеточных стенках, межклетниках и в специализированных запасающих фенол эпибластах в виде аморфного вещества или гранулированных включений различной степени агрегации.

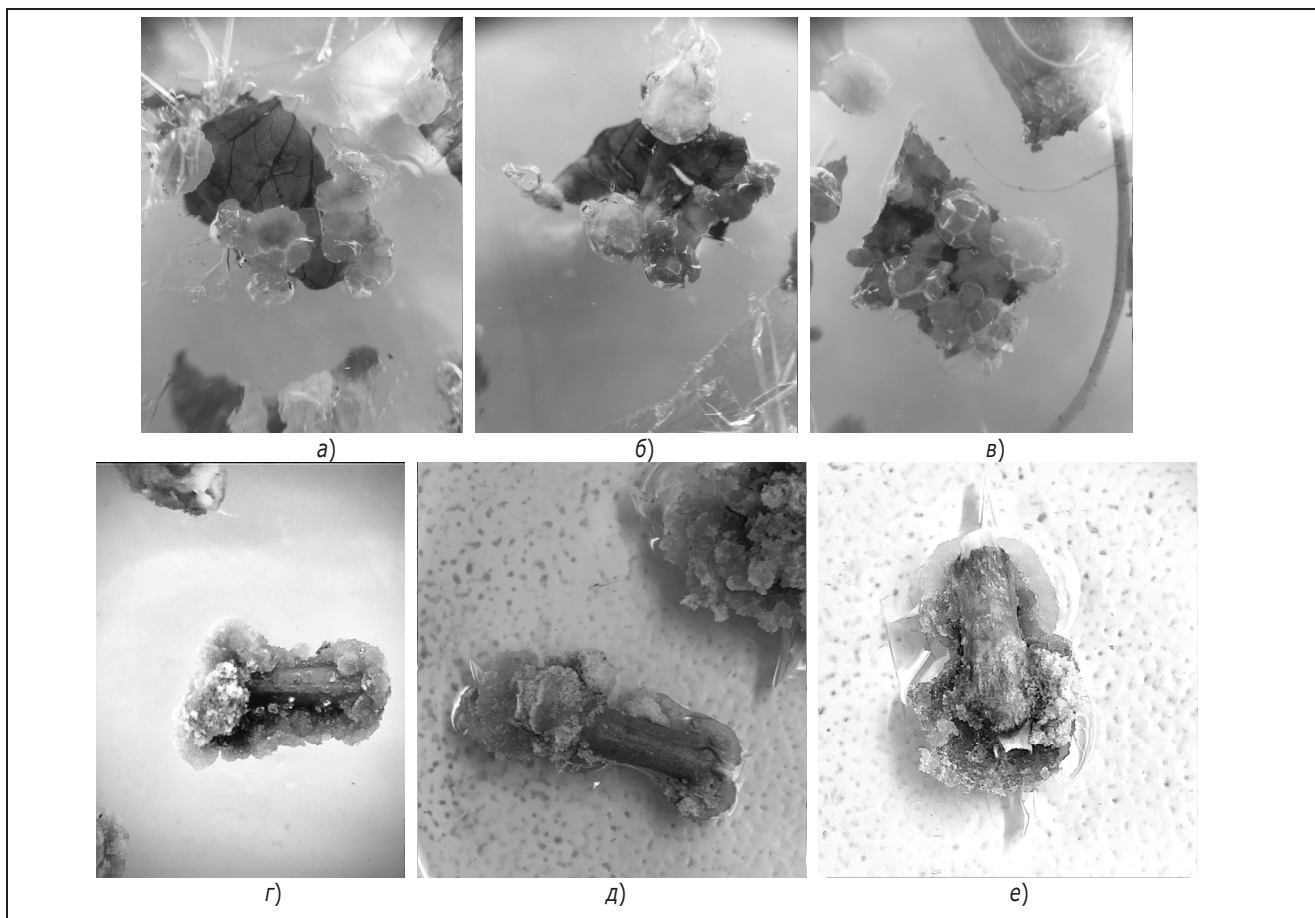


Рис. 1. Образование первичной каллусной ткани в местах поранения: а-в – лист, г-е – стебель (а, д – сорт Jewel, в, г – сорт Порто Рико; б, е – сорт Пурпл)

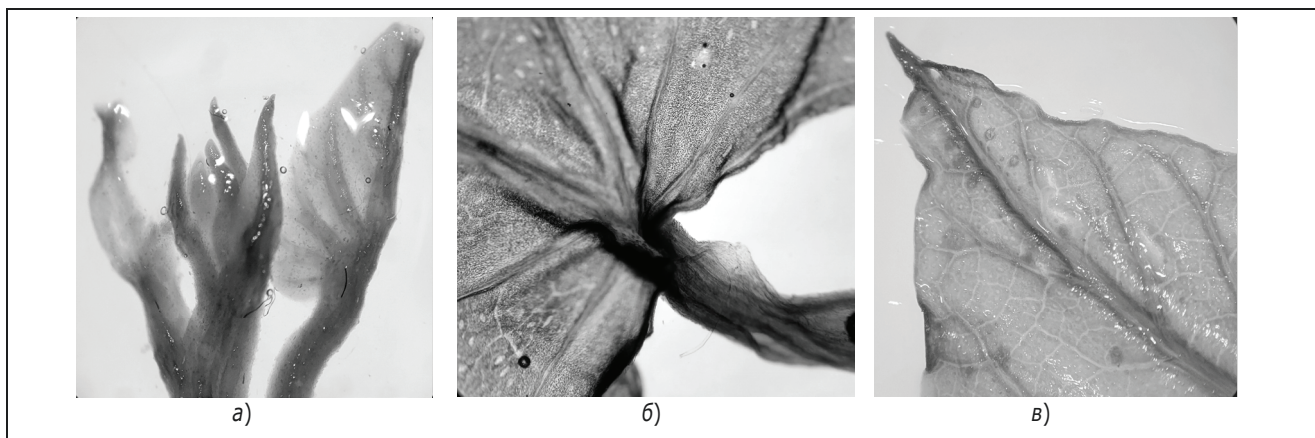


Рис. 2. Локализация фенольных соединений в меристематических (а) и проводящих (б-в) тканях *I. batatas*, используемых в качестве эксплантов для иницирования каллусных культур

Реакция с ванилиновым реактивом на флаваны в исследуемых эксплантах носит тождественный характер с реакцией клеток на реактив Fast Blue на суммарное содержание растворимых фенольных соединений, что может свидетельствовать о доминировании соединения флавоноидного ряда в феноль-

ном комплексе экспланта. Несмотря на то, что образование полифенолов присуще всем органам и тканям растений, они могут иметь различный состав, концентрацию и локализацию, обусловленную физиологическими функциями и морфологическими особенностями первичных эксплантов.

Таким образом, сопоставление полученных данных привело к заключению, что каллусная ткань формировалась в тех местах листовой пластинки, в которых образование и локализация фенольных соединений незначительны. Вероятно, это связано с тем, что высокое содержание фенольных соединений приводит к ингибированию многих физиологических процессов.

Существенное влияние на интенсивность образования каллусной ткани, ее консистенцию и

цвет оказывали применяемые ауксины (рис. 3).

Так, культивирование эксплантов на питательной среде, содержащей ИУК, приводило к формированию каллусной ткани желто-зеленого цвета средней плотности (рис. 3,а). Причем начало каллусогенеза отмечено уже на 12-е сутки с начала культивирования. При использовании НУК каллусная ткань имела рыхлую консистенцию и светло-желтый цвет (рис. 3,б). В этом варианте начало каллусогенеза отмечено на 15–17-е сутки.

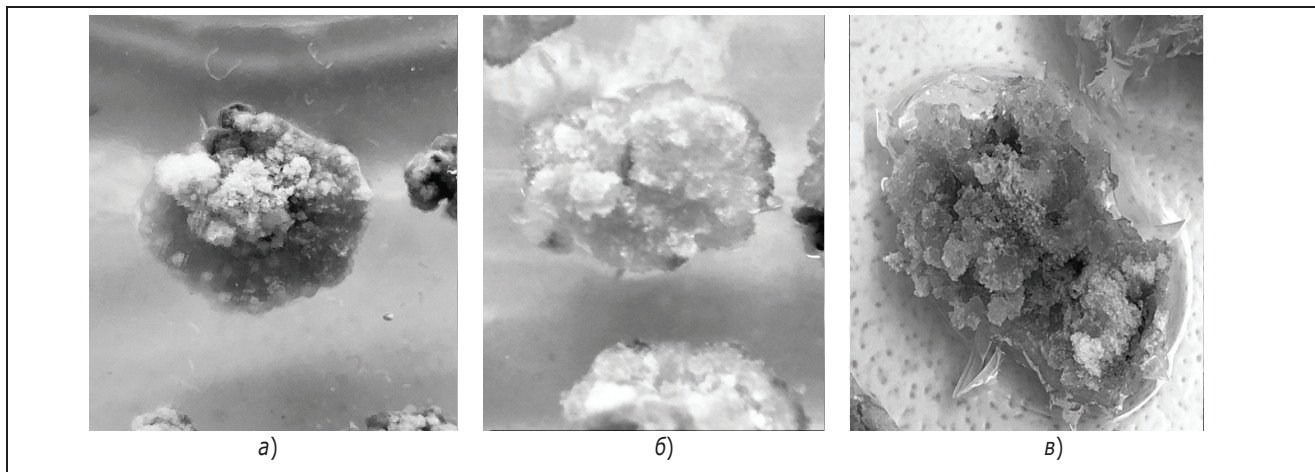


Рис. 3. Формирование каллусной ткани на питательных средах с разным содержанием ауксинов: а – ИУК, б – НУК, в – 2,4-Д

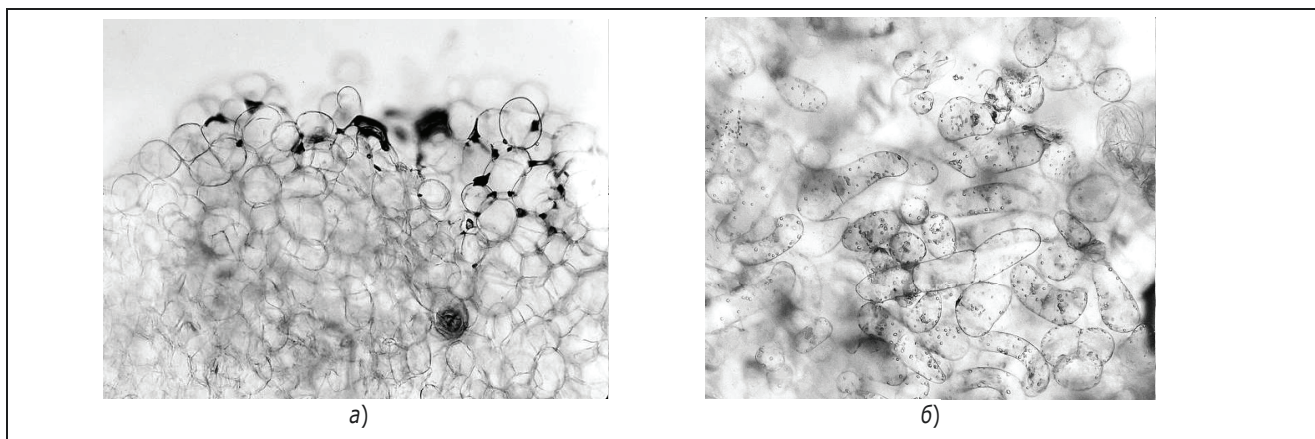


Рис. 4. Клетки каллусной ткани, полученной на питательной среде с НУК (а) и 2,4-Д (б)

Иная картина наблюдалась при культивировании эксплантов на среде, содержащей 2,4-Д. Несмотря на то, что процесс образования каллусной ткани отмечен уже на 12-е сутки, каллусная ткань имела рыхлую консистенцию, светло-коричневый цвет с белыми новообразованиями каллусной ткани (рис. 3,в). Однако в процессе культивирования такая каллусная ткань постепенно погибала. Поэтому добавление в состав питательной среды 2,4-Д оказалось нецелесообразным, и в дальнейших

экспериментах данный гормон не использовали.

Изучение каллусной ткани на временных препаратах позволило установить, что ткань, полученная на питательной среде, содержащей НУК, состояла из одинаковых паренхимных клеток, округлой формы, с крупной вакуолью (рис. 4,а).

В варианте с 2,4-Д каллусная ткань состояла из гетерогенных по форме паренхимных клеток округлой и вытянутой формы с крупной вакуолью (рис. 4,б).

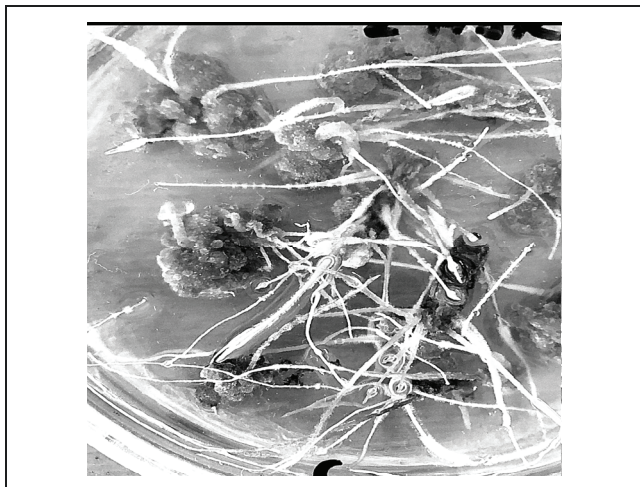


Рис. 5. Образование корней из каллусной ткани, культивируемой на среде МС с БАП 1 мг/л и ИУК 0,5 мг/л

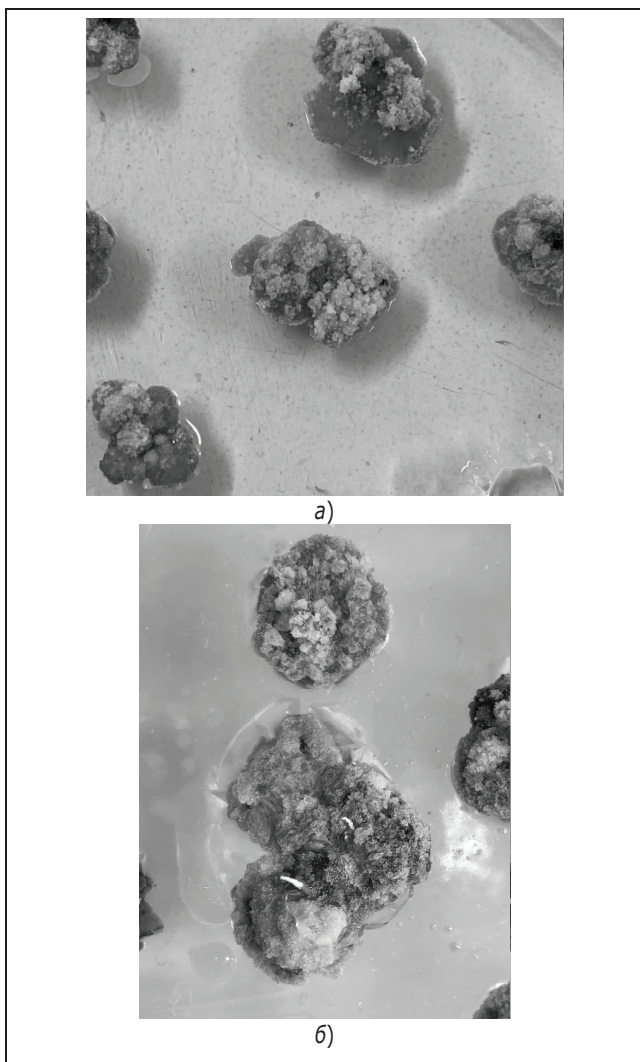


Рис. 6. Внешний вид не морфогенной каллусной ткани, полученной на среде с НУК 0,5 мг/л в сочетании с БАП 1 мг/л: а – сорт Порто Рико, б – сорт Пурпл

Для всех трех изучаемых сортов батата характерно формирование клеток округлой формы под действием НУК и вытянутых и продолговатых клеток – 2,4-Д. Наиболее благоприятные условия для получения хорошо пролиферирующей каллусной ткани – это присутствие в составе питательной среды НУК. В этом варианте каллусная ткань сохраняла высокую пролиферативную активность на протяжении ряда субкультивирований. В процессе культивирования в варианте с ИУК каллусная ткань приобретала плотную консистенцию, зеленела на свету и можно было наблюдать массовое образование корней (ризогенез) (рис. 5). Получение такой ризогенной каллусной ткани не позволяет использовать ее в дальнейших экспериментах, в частности по клеточной селекции *in vitro*.

Хорошо пролиферирующую каллусную ткань в течение трех пассажей получали на питательной среде МС, содержащей НУК 0,5 мг/л в сочетании с БАП 1 мг/л. Данная каллусная ткань характеризовалась средней плотностью, имела светло-зеленый оттенок с вкраплениями желтого цвета, без признаков морфогенеза. Однако для сорта Пурпл в каллусной ткани можно было заметить появление участков с антоциановой окраской (рис. 6). Вероятно, это связано с биологическими особенностями самого растения, для которого характерно образование антоцианов в различных органах, начиная от клубнеплодов и заканчивая листовыми пластинками.

Характеристики длительно пассируемой, хорошо пролиферирующей каллусной ткани, полученной на питательной среде МС, содержащей НУК и БАП, приведены в табл. 2.

Анализируя полученные результаты, следует отметить, что каллусогенез зависит не только от применяемого ауксина, но и от типа первичного экспланта, а также от исследуемого сорта. На примере исследуемых сортов экспериментально установлено, что сорт с повышенным содержанием антоцианов в клубнеплоде и других частях растения обладает меньшей способностью к каллусогенезу. Причем этот процесс не зависит от исследуемого первичного экспланта. Так, для сорта Пурпл (фиолетовый) прирост листового каллуса на 20%, а стеблевого каллуса – на 38% меньше по сравнению с сортом Порто Рико (белый) и Jewel (оранжевый). Аналогичная закономерность была получена и при расчете индекса роста и удельной скорости роста каллусной ткани.

Таблица 2. Характеристика каллусной ткани, полученной на питательной среде МС, содержащей НУК

Показатель	Листовой каллус			Стеблевой каллус		
	Порто Рико	Jewel	Пурпл	Порто Рико	Jewel	Пурпл
Прирост по диаметру, см	1,25	1,31	1,0	1,85	1,98	1,15
Индекс роста, I	2,13	2,24	1,50	3,88	3,94	1,63
Удельная скорость роста, μ	0,037	0,039	0,030	0,55	0,059	0,031

Индекс роста листового и стеблевого каллуса для сорта Пурпл ниже данных показателей сортов Порто Рико и Jewel в среднем на 30 и 60% соответственно, а удельная скорость роста – в среднем на 19 и 44% соответственно.

Таким образом, на основании проведенных исследований установлено, что изучаемые ауксины оказывают специфическое влияние на индукцию образования каллусной ткани из листовых и стеблевых эксплантов батата. Показано, что только НУК способна индуцировать образование каллусной ткани, сохраняющей высокую пролиферативную активность на протяжении длительного культивирования. Применение ИУК и 2,4-Д в исследованиях по каллусогенезу для батата нецелесообразно.

Далее исследовали особенности образования и локализации полифенолов – активных метаболитов, которые являются неотъемлемой частью изучения физиолого-биохимического статуса растений, в каллусных культурах, полученных под действием разных ауксинов. Биосинтез и накопление вторичных соединений, в том числе и фенольной природы, отличается пластичностью и зависит от видовой принадлежности растений, исследуемого органа, стадии онтогенеза и условий произрастания [17].

Каллусные культуры, инициированные из одного и того же вида растений, могут обладать различной способностью к накоплению полифенолов, что отражается и на их внутритканевой локализации. Проведенные исследования показали, что уже на начальных этапах культивирования каллусные ткани *I. batatas* отличались между собой по биосинтетической активности, что подтвердилось гистохимическими исследованиями. Так, на границе инициации каллусной ткани на первичном экспланте формировался «отделяющий» защитный слой клеток с фенольными соединениями (рис. 7,б,д). Уже на первых пассажах отмечалось массовое образование специализированных фенолзапасяющих клеток (эпобластов), в которых накапливались фенольные соединения в виде мел-

ко- и крупногранулированных включений. Большие скопления эпобластов наблюдали как в центральной, так и в периферической части каллусной ткани.

В следующей серии экспериментов изучали зависимость образования и локализации фенольных соединений в каллусной ткани от применяемых ауксинов.

В научной литературе неоднократно сообщалось, что происхождение экспланта и гормональный состав питательной среды оказывает значимое влияние на биосинтетическую способность каллусных культур синтезировать полифенолы [18, 19]. Ввиду того, что ткани первичного экспланта содержат сильно дифференцированные зоны по степени накопления фенольных соединений, целесообразно не только оценить успешность процесса каллусогенеза в зависимости от степени накопления фенольных соединений в первичном экспланте, но и их локализацию в инициируемой каллусной ткани в зависимости от применяемых ауксинов.

У неморфогенной каллусной ткани, полученной на среде с НУК 0,5 мг/л в сочетании с БАП 1 мг/л (сорт Пурпл), на начальных этапах каллусогенеза отмечалось образование фенолнакапливающих зон, отделяющих эксплант от дедифференцированных клеток. Среди каллусной массы изредка встречались значительно уступающие по размерам клетки с флаванами (реакция с ванилиновым реактивом), которые имели тенденцию к агрегации. Полифенолы, в том числе и флавановой природы полностью заполняли содержимое указанных клеток, которые представляли собой мини-эпобласты (рис. 7,в). По мере пассирования каллусной ткани полифенолы локализовались в вакуолях некоторых клеток в виде аморфного вещества и мелкогранулированных включений (рис. 7,з).

В результате гистохимических исследований установлено, что в каллусных культурах, инициированных из листовых пластинок и выращиваемых на питательной среде с НУК, содержание

клеток с фенольными соединениями меньше, чем у каллуса, полученного также из листовых пластинок, но на среде с 2,4-Д. Это, вероятно, и привело к быстрой гибели ткани, инициируемой на среде с 2,4-Д. Такая закономерность характерна для трех изучаемых сортов батата.

При выращивании каллусных культур на питательной среде содержащей 2,4-Д характерно наличие большого числа фенолнакапливающих

клеток (эпибластов), которые локализовались среди дедифференцированных клеток не только единично, но и в виде групп, иногда значительно превышая их по своим размерам (рис. 8, а,б). В эпибластах полифенолы находились в виде мелко и крупногранулированных включений. Яркая реакция на флаваны отмечалась в цитоплазме дедифференцированных клеток и межклетниках.

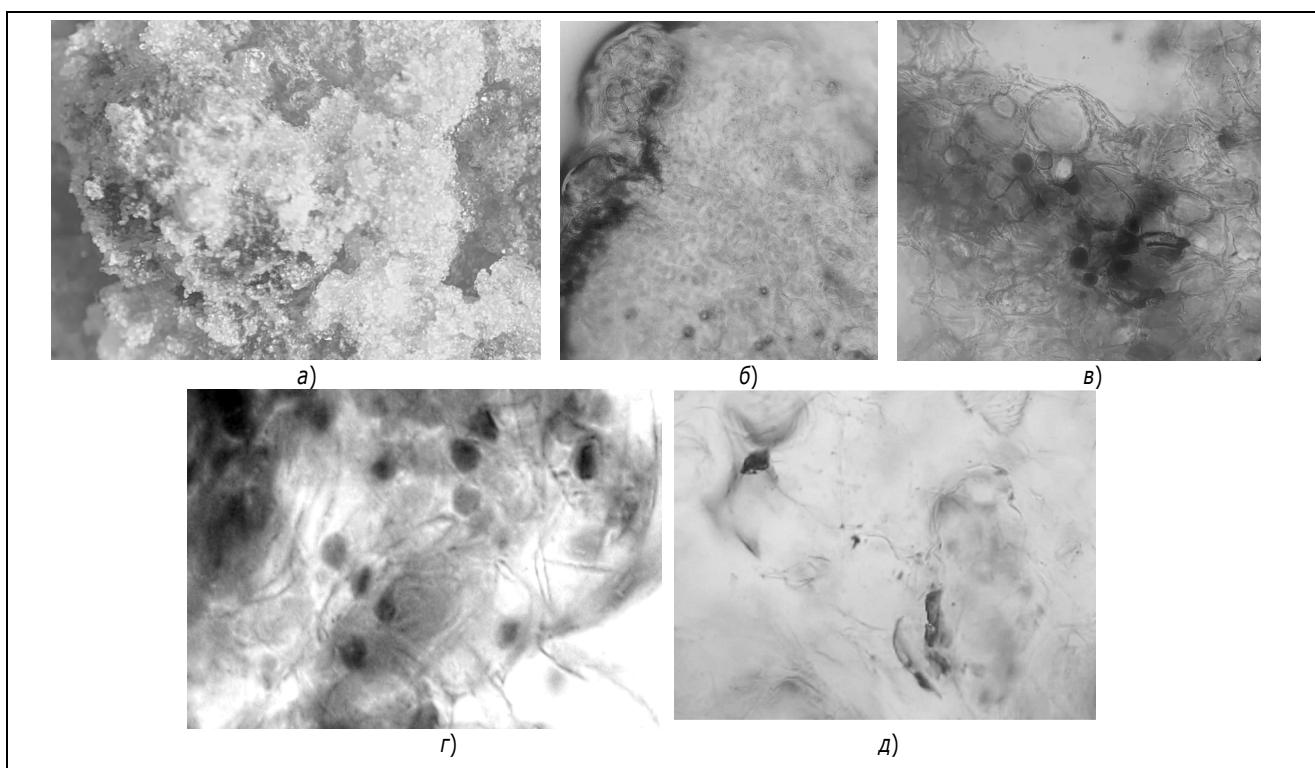


Рис. 7. Каллусная ткань: а – полученная на среде с НУК (сорт Пурпл); б – локализация полифенолов при инициации первичного каллуса на экспланте; в – локализация флаванов в каллусной ткани; г, д – реакция на суммарное содержание фенольных соединений с реактивом Fast blue

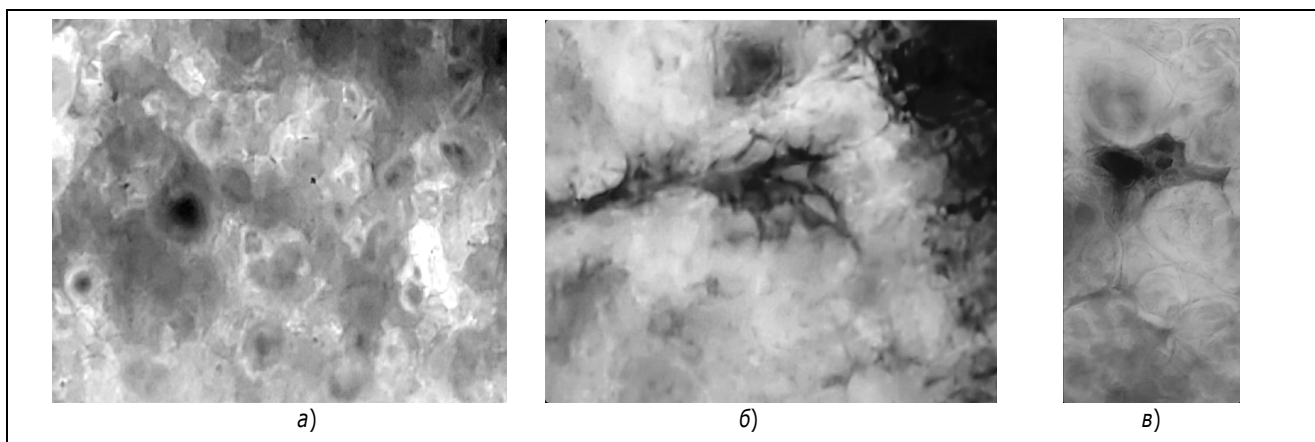


Рис. 8. Локализация фенольных соединений в каллусной ткани, культивируемой на среде, содержащей 2,4-Д в эпибластах (а, б) и межклетниках (б, в)

В процессе культивирования каллусной ткани, полученной на среде с 2,4-Д, отмечалось появление некротических участков, которые привели к полной гибели ткани. Для нежизнеспособной каллусной ткани, находящейся на терминальной фазе субкультивирования, характерно повсеместное присутствие полифенолов. Они присутствовали в клеточных стенках, межклетниках и эпибластах, как в виде аморфного вещества, так и в виде включений различной степени агрегации. В толще каллусной ткани хаотично встречались зоны с многочисленным скоплением мелких эпибластов, полость которых была заполнена фенольными соединениями (рис. 9,б,в). Реакция на суммарное содержание растворимых фенольных соединений тождественна реакции с ванилиновым реактивом на флавановы, что указывает на преобладание низкомолекулярных веществ флаванового ряда у данной линии каллусной культуры.

Таким образом, гипераккумуляция полифенолов в каллусной ткани может являться косвенной причиной апоптоза каллусной культуры [16].

У ризогенной каллусной ткани реакция на фенольные соединения в меристематических очагах не была единична и коррелировала с реакцией клеток на ванилиновый реактив, свидетельствующая о присутствии флаванов. Клетки с фенольными соединениями в виде небольших очагов встречались в центральной и периферийной зонах каллусной ткани (рис. 10,б).

При этом реакция на суммарное содержание фенольных соединений наблюдалась в клеточных стенках, цитоплазме и в вакуолях клеточных вместилищ, где они находились в виде мелкогранулированного материала, а реакция с ванилиновым реактивом (на флавановы) – преимущественно в клеточных стенках (рис. 10,г) и крайне редко в цитоплазме некоторых клеток.

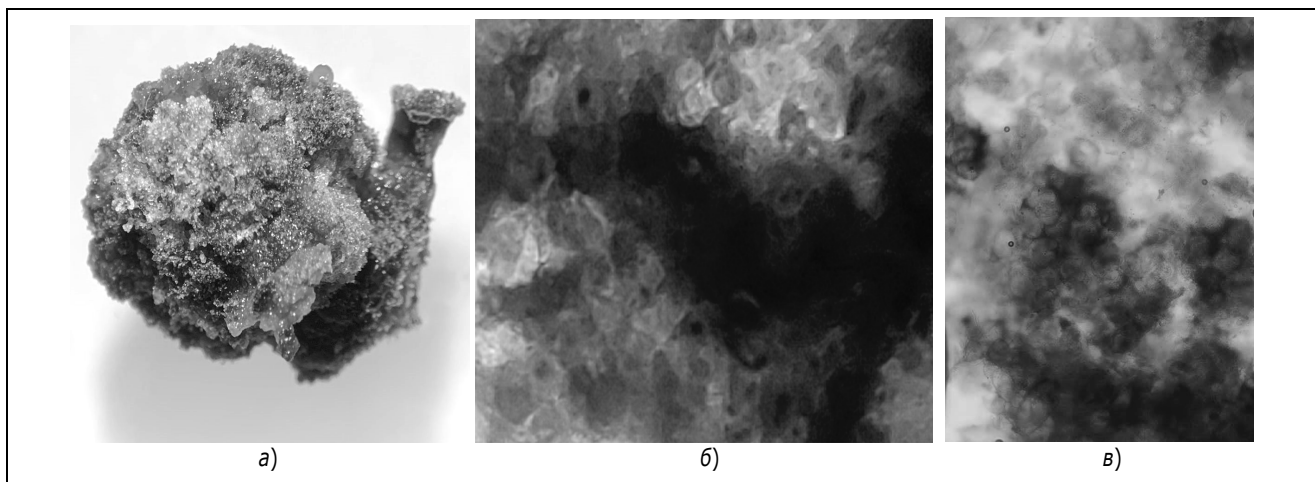


Рис. 9. Каллусная ткань, полученная на среде, содержащей 2,4-Д (а), локализация фенольных соединений в нежизнеспособной каллусной ткани (б, в)

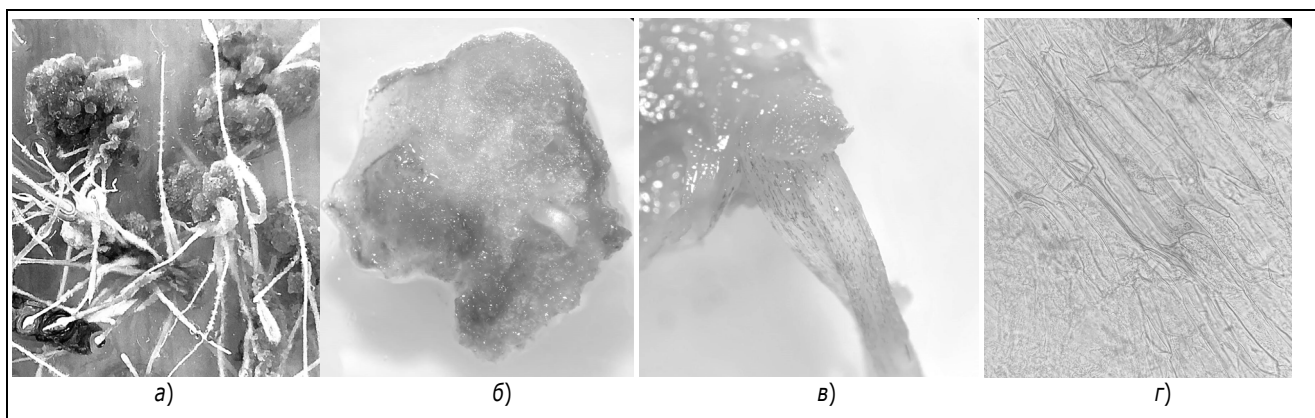


Рис. 10. Каллусная ткань, полученная на среде с ИУК (а), реакция с ванилиновым реактивом на наличие флаванов в каллусной ткани (б), локализация флаванов в зоне ризогенеза каллусной ткани (в), локализация флаванов в клеточных стенках микрокорней (г)

Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследуемые растения активно синтезируют соединения фенольной природы, которые принимают участие в процессах фотосинтеза, дыхания, трансдукции энергии, аллелопатии, а также защиты клеток от патогенов и разных стрессовых факторов [17].

В условиях *in vitro* не только сохраняется способность клеток к синтезу фенольных соединений, но и значительно изменяется под влиянием гормонального состава питательной среды, что подтверждается данными гистохимических исследований. Поскольку в условиях *in vitro* сохраняется присущая интактным растениям *I. batatas* (L.) биосинтетическая способность к образованию различных классов полифенолов, но в менее выраженной степени, можно судить об определенной конститутивной составляющей фенольного метаболизма исследуемых растений. Возможно, это связано с тем, что синтез многих вторичных соединений приурочен к специализированным дифференцированным тканям, в то время как каллусные культуры – это неорганизованные, дедифференцированные клетки. Такое изменение внутренней организации тканей в условиях *in vitro* и влияет на образование вторичных соединений, проявляя при этом сорто- и органоспецифические особенности в локализации полифенолов. Сохранение высокой биосинтетической способности каллусными тканями исследуемых сортов *I. batatas* (L.) в условиях *in vitro*, позволяет судить о том, что они могут служить источником специфических биологически активных веществ.

ВЫВОДЫ

На основании проведенных исследований установлено, что растения батата обладают способностью к синтезу полифенолов, в том числе и флаванового ряда, которая сохраняется в условиях *in vitro*. Значительное накопление фенольных соединений тканями интактных растений не только препятствует процессу каллусообразования, но и может стать косвенной причиной апоптоза каллусных культур. Гормональный состав питательных сред оказывает непосредственное влияние на ростовые характеристики каллусной ткани *in vitro*, а также на ее биосинтетический потенциал.

Работа выполнена при поддержке Министерства сельского хозяйства в рамках выполнения научно-технического задания на 2022 год.

ЛИТЕРАТУРА

1. Franck A. Technological functionality of inulin and oligofructose. *Br. J. Nutr.* 2002; 87: S287–S291.
2. Kumar J., Rani K., Datt C. Molecular link between dietary fibre, gut microbiota and health. *Mol. Biol. Rep.* 2020; 47: 6229–6237.
3. Sabater-Molina M., Larqué E., Torrella F., Zamora S. Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. *J. Physiol. Biochem.* 2009; 65: 315–328.
4. Ahmed W., Rashid S. Functional and therapeutic potential of inulin: A comprehensive review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2019; 59: 1–13.
5. Saeed F., Pasha I., Arshad M.U., Anjum F.M., Hussain S., Rashed R., Nasir M.A., Shafique B. Physiological and nutraceutical perspectives of fructan. *Int. J. Food Prop.* 2015; 18: 1895–1904.
6. Shoaib M., Shehzad A., Omar M., Rakha A., Raza H., Sharif H.R., Shakeel A., Ansari A., Niazi S. Inulin: Properties, health benefits and food applications. *Carbohydr. Polym.* 2016; 147: 444–454.
7. Shang H.M., Zhou H.Z., Yang J.Y., Li R., Song H., Wu H.X. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activities of inulin. *PLoS ONE.* 2018; 13: 19–22.
8. Namanda S., Gibson R.W., Kirimi S. Sweet potato seed systems in Uganda, Tanzania and Rwanda. *Journal of Sustainable Agriculture.* 2011; 35: 870–884.
9. Ogero K.O., Gitonga N.M., Mwangi M., Ombori O., Ngugi M. A low-cost medium for sweet potato micro propagation. *African Crop Science Conference Proceedings.* 2011; 10: 57–63.
10. Cha-um S., Kirdmanee C. Diseases free production of sugarcane varieties (*Saccharum officinarum* L.) using *in vitro* meristem culture. *Biotechnology.* 2006; 5(4): 443–448.
11. Doliński R., Olek O. Micropropagation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) from node explants. *Acta Sci Pol., Hortorum Cultus.* 2013; 12(4): 117–127.
12. Liu Q.C., Zhai H., Wang Y., Zhang D.P. Efficient plant regeneration from embryonic suspension cultures of sweet potato. *In vitro Cell Developmental Biology-Plant.* 2001; 37: 564–567.
13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962; 15: 473–497.
14. Soukupova J., Cvikrova M., Albrechtova J., Rock B.N., Eder J. Histochemical and Biochemical Approaches to the Study of Phenolic Compounds and Peroxidases in Needles of Norway Spruce (*Picea abies*). *New Phytol.* 2000; 146: 403–414.
15. Лакин Г.Ф. Биометрия: учеб. пособие для биол. спец. вузов. М.: Высшая школа. 1990. 352 с.
16. Дубравина Г.А., Зайцева С.М., Загоскина Н.В. Изменения в образовании и локализации фенольных соединений при дедифференциации тканей тисса ягодного и тисса канадского в условиях *in vitro*. *Физиология растений.* 2005; 52: 755–762.
17. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и их роль в жизни растения. *LVI Тимирязевские чтения.* М.: Наука. 1996. 45 с.
18. Тулупова Е.С., Остроженкова Е.Г., Слепян., Саканян Е.И. Влияние различных цитокининов на рост селективных штаммов *Panax ginseng* С.А.Мей и *Panax quinquefolius* L. с герматраном Lx 5 и содержание в них гликозидов. *Биотехнология.* 2002; 3: 30–36.
19. Калашникова, Е.А., Зайцева С.М., Доан Тху Тхуи, Киракосян Р.Н. Влияние регуляторов роста на морфогенетическую активность эксплантов *Dioscorea nipponica* Makino и образование полифенолов. *Международный научно-исследовательский журнал.* 2020; 6-2(96): 6–11.

Поступила 29 мая 2022 г.

THE EFFECT OF THE HORMONAL COMPOSITION OF THE NUTRIENT MEDIUM AND ENDOGENOUS POLYPHENOLS ON THE FORMATION OF CALLUS TISSUE *IPOMOEA BATATAS* (L.)

© Authors, 2022

E.A. Kalashnikova

Dr.Sc. (Biol.), Professor, Department of Biotechnology,
Russian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazeva (Moscow, Russia)
E-mail: kalash0407@mail.ru

R.N. Kirakosyan

Ph.D. (Biol.), Associate Professor, Department of Biotechnology,
Russian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazeva (Moscow, Russia)
E-mail: mia41291@mail.ru

H.G. Abubakarov

Post-graduate Student, Associate Professor, Department of Biotechnology,
Russian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazeva (Moscow, Russia)
E-mail: khrho95@mail.ru

S.M. Zaitseva

Ph.D. (Biol.), Associate Professor, Department of Biotechnology,
Russian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazeva (Moscow, Russia)
E-mail: smzaitseva@yandex.ru

Relevance. *Ipomoea batatas* (L.) is a valuable agricultural crop, in the tubers of which inulin accumulates, a natural polysaccharide that has no synthetic analogues. Market analysis shows that, as a rule, in the production of functional food products, Russian manufacturers use imported inulin. Currently, globalization, the information revolution, as well as the sanctions policy have exacerbated significant problems of the world economy, which increases the relevance of import substitution of a number of goods and products. It is known that cold stress is one of the main environmental factors limiting agricultural production. Low positive temperatures have a negative impact on the growth, development, productivity and yield of *I. batatas* (L.) plants. It is possible to create such plants using cell biotechnology methods, in particular, *in vitro* cell selection, which is carried out on a callus culture.

Purpose of the study. To study the effect of the hormonal composition of the nutrient medium and endogenous polyphenols on the formation of the callus tissue of sweet potatoes (*I. batatas* (L.)) *in vitro*.

Material and methods. The object of the study were three varieties of *I. batatas* (L.) (Purple, Jewel, Porto Rico). Callus tissue was obtained from segments of leaf blades and stem internodes, which were isolated from aseptic sweet potato plants. Explants were cultured on MS nutrient medium containing BAP 0.5 mg/l and 1 mg/l NAA/IAA/2,4-D. The localization of phenolic compounds was studied in leaves, stems, and apical buds of microclones. In addition, localization was studied in the callus tissue obtained on different auxins. Histochemical methods were used for this. For the amount of phenolic compounds, the material was stained with 0.08% Fast Blue reagent raster. To study the localization of flavans (catechins and proanthocyanidins), a reaction with a vanillin reagent in hydrochloric acid vapors was used.

Results. It was found that the auxins used had a significant effect on the intensity of callus tissue formation, its consistency and color. A well-proliferating callus tissue of light yellow color was obtained on a medium with NAA, a dense, green rhizogenic callus tissue was formed on a medium with IAA, and a dark brown tissue was formed on a medium with 2,4-D, which died during cultivation. As a rule, callus tissue was formed in those places where the formation and localization of phenolic compounds was insignificant.

Conclusion. It was found that in callus cultures initiated from leaf plates and grown on a nutrient medium with NAA, the content of cells with phenolic compounds was less than that of callus obtained from leaf plates as well, but on a medium with 2,4-D.

Key words: sweet potato, callus tissue, auxins, polyphenols, *in vitro*, morphogenesis.

For citation: Kalashnikova E.A., Kirakosyan R.N., Abubakarov H.G., Zaitseva S.M. The effect of the hormonal composition of the nutrient medium and endogenous polyphenols on the formation of callus tissue *Ipomoea batatas* (L.). Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2022;25(11):46–58. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-11-08>

REFERENCES

1. Franck A. Technological functionality of inulin and oligofructose. Br. J. Nutr. 2002; 87: S287–S291.
2. Kumar J., Rani K., Datt C. Molecular link between dietary fibre, gut microbiota and health. Mol. Biol. Rep. 2020; 47: 6229–6237.
3. Sabater-Molina M., Larqué E., Torrella F., Zamora S. Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. J. Physiol. Biochem. 2009; 65: 315–328.
4. Ahmed W., Rashid S. Functional and therapeutic potential of inulin: A comprehensive review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2019; 59: 1–13.
5. Saeed F., Pasha I., Arshad M.U., Anjum F.M., Hussain S., Rasheed R., Nasir M.A., Shafique B. Physiological and nutraceutical perspectives of fructan. Int. J. Food Prop. 2015; 18: 1895–1904.

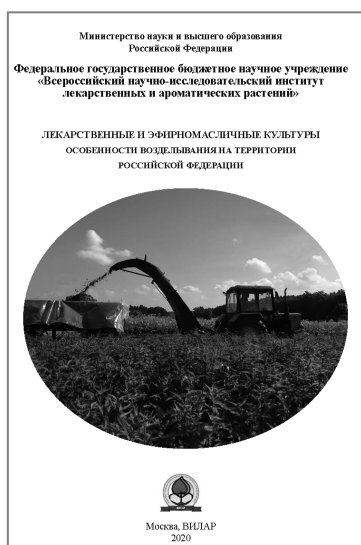
6. Shoaib M., Shehzad A., Omar M., Rakha A., Raza H., Sharif H.R., Shakeel A., Ansari A., Niazi S. Inulin: Properties, health benefits and food applications. *Carbohydr. Polym.* 2016; 147: 444–454.
7. Shang H.M., Zhou H.Z., Yang J.Y., Li R., Song H., Wu H.X. In vitro and in vivo antioxidant activities of inulin. *PLoS ONE.* 2018; 13: 19–22.
8. Namanda S., Gibson R.W., Kirimi S. Sweet potato seed systems in Uganda, Tanzania and Rwanda. *Journal of Sustainable Agriculture.* 2011; 35: 870–884.
9. Ogero K.O., Gitonga N.M., Mwangi M., Ombori O., Ngugi M. A low-cost medium for sweet potato micro propagation. *African Crop Science Conference Proceedings.* 2011; 10: 57–63.
10. Chaum S., Kirdmanee C. Diseases free production of sugarcane varieties (*Saccharum officinarum* L.) using in vitro meristem culture. *Biotechnology.* 2006; 5(4): 443–448.
11. Doliński R., Olek O. Micropropagation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) from node explants. *Acta Sci Pol., Hortorum Cultus.* 2013; 12(4): 117–127.
12. Liu Q.C., Zhai H., Wang Y., Zhang D.P. Efficient plant regeneration from embryonic suspension cultures of sweet potato. *In Vitro Cell Developmental Biology-Plant.* 2001; 37: 564–567.
13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962; 15: 473–497.
14. Soukupova J., Cvikrova M., Albrechtova J., Rock B.N., Eder J. Histochemical and Biochemical Approaches to the Study of Phenolic Compounds and Peroxidases in Needles of Norway Spruce (*Picea abies*). *New Phytol.* 2000; 146: 403–414.
15. Lakin G.F. *Биометрија: учеб. пособие длја биол. спец. вузов. М.: Высшaja shkola.* 1990. 352 s.
16. Dubravina G.A., Zajceva S.M., Zagorskina N.V. Изменения в образovanii и локализacии фенол'ных соединений при dedifferenciacii ткanej тисса jagodного i тисса kanadского в uslovijah in vitro. *Fiziologija rastenij.* 2005; 52: 755–762.
17. Zaprometov M.N. Фенол'ные соединения i ih rol' v zhizni rastenija. *LVI Timirjazevskie chtenija. М.: Nauka.* 1996. 45 s.
18. Tulupova E.S., Ostrozhenkova E.G., Slepjan., Sakanjan E.I. Vlijanie razlichnyh citokininov na rost selektivnyh shtammov *Panax ginseng* S.A.Meu i *Panax quinquefolius* L. s germatranom Lx 5 i sodержanie v nih glikozidov. *Biotehnologija.* 2002; 3: 30–36.
19. Kalashnikova, E.A., Zajceva S.M., Doan Thu Thui, Kirakosjan R.N. Vlijanie reguljatorov rosta na morfogeneticheskuju aktivnost' jeksplanotov *Dioscorea nipponica* Makino i obrazovanie polifenolov. *Mezhdunarodnyj nauchno-issledovatel'skij zhurnal.* 2020; 6-2(96): 6–11.



ИЗДАНИЯ ФГБНУ ВИЛАР

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ И ЭФИРНОМАСЛИЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ: ОСОБЕННОСТИ ВОЗДЕЛЫВАНИЯ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ Под общей редакцией академик РАН Н.И. Сидельникова

Авторы: Аникина А.Ю., Бушковская Л.М., Басалаева И.В. и др.



Посвящается 90-летию ВИЛАР и его ученым-растениеводам

В книге представлены обобщенные материалы многолетних исследований Всероссийского научно-исследовательского института лекарственных и ароматических растений, связанные с разработкой технологий возделывания лекарственных культур в различных почвенно-климатических зонах Российской Федерации. В издании сконцентрированы сведения по выращиванию лекарственных культур: описана их биология, медицинское значение, особенности агротехники и семеноводства, приведены данные по новым сортам и требования к качеству получаемого сырья. Указаны основные вредители и болезни лекарственных растений, обозначены условия достижения оптимальной фитосанитарной обстановки в агробиоценозах. Данная книга рассчитана на широкий круг читателей: агрономов и фермеров, занимающихся возделыванием лекарственных культур, научных сотрудников, специализирующихся в области лекарственного растениеводства, ее материалы также могут быть полезны для студентов, аспирантов и преподавателей высших учебных заведений агрономического и фармацевтического профиля подготовки.

По вопросам приобретения книг и монографий обращаться в ФГБНУ ВИЛАР:
117216, г. Москва, ул. Грина, д. 7; +7 (495) 338-11-09; e-mail: vilarnii@mail.ru
<http://vilarnii.ru/institute/our-publications/>