

**STUDY OF FACTORS INFLUENCING THE INDUCTION OF CALLUSOGENESIS
IN *ROBINIA PSEUDOACACIA* L. IN VITRO****Fomenko N. G., Zholobova O. O.***Federal State Budget Scientific Institution «Federal Scientific Centre of Agroecology, Complex Melioration and Protective Afforestation of the Russian Academy of Sciences» (FSC of Agroecology RAS)
Volgograd, Russian Federation*

Corresponding author E-mail: fomenko-n@vfanc.ru

Received 22.03.2024

Submitted 20.05.2024

The studies were carried out as part of the state task of the Research and Development Institute of the Federal Scientific Center of Agroecology of the Russian Academy of Sciences PAH № 122020100427-1 "Develop the scientific basis for the conservation and reproduction of valuable genotypes of trees and shrubs in in vitro culture"**Summary**

The article presents the results of a study on the influence of auxin, light and explant type on the induction of callus genesis by *Robinia pseudoacacia* L. Optimal auxin concentrations and the most suitable explant for obtaining viable callus were determined

Abstract

Introduction. The use of selected material is an important condition for achieving high quality and ameliorative efficiency of protective forest plantations in agroforestry. The method of cultivation of isolated tissues on artificial nutrient media under in vitro conditions is widely used in biotechnology. Development and optimization of the processes of induction and obtaining morphogenic callus play an important role not only in scientific research, but also in industrial crop production. **Objects.** *Robinia pseudoacacia* L. and two auxins 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and indole-3-acetic acid (IAA) were selected as the object of study. **Research methods.** The study was carried out on the basis of FSC Agroecology RAS in the laboratory of biotechnology. Segments of leaf, seedling, hypocotyl, and root were used as explants. Cultivation was carried out for 4 weeks on Murashige and Scoog (MS) nutrient medium supplemented with auxins 2,4-D and IAA in three different concentrations: 0.1 mg/l; 0.5 mg/l; 1 mg/l. To evaluate the effect of light conditions on the induction of callusogenesis, half of the experimental samples were cultured in the dark, the other half with a photoperiod of 16 hr. At the end of the cultivation period, morphological parameters (color, structure), induction and average fresh weight of callus were evaluated. **Results and conclusions.** Based on the results of this study, it was found that *R. pseudoacacia* has a high capacity for callusogenesis, direct and indirect morphogenesis, and callus induction has a direct correlation with auxin concentration. The results showed that light is essential for callus formation and cultivation, darkening of callus tissue occurs faster when cultured in the dark. Hypocotyl explants and auxin 2,4-D at a concentration of 0.5 mg/l are the most suitable for induction and obtaining callus tissue of loose and medium-dense structure for further multiplication.

Keywords: callus, callus induction, explants, *Robinia pseudoacacia* L.**Citation.** Fomenko N. G., Zholobova O. O. Study of factors influencing the induction of callusogenesis in *Robinia pseudoacacia* L. in vitro. *Proc. of the Lower Volga Agro-University Comp.* 2024. 3(75). 185-194 (in Russian). DOI:10.32786/2071-9485-2024-03-21.**Author's contribution.** Author of this research paper have directly participated in the planning, execution, or analysis of this study.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

УДК 581.143.6

**ИЗУЧЕНИЕ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ИНДУКЦИЮ КАЛЛУСОГЕНЕЗА
У *ROBINIA PSEUDOACACIA* L. В КУЛЬТУРЕ IN VITRO****Фоменко Н. Г., аспирант, младший научный сотрудник****Жолобова О. О., кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник***ФГБНУ «Федеральный научный центр агроэкологии, комплексных мелиораций и защитного
лесоразведения Российской академии наук» (ФНЦ агроэкологии РАН)
г. Волгоград, Российская Федерация***Исследования проведены в рамках выполнения государственного задания НИР
ФНЦ агроэкологии РАН № 122020100427-1 «Разработать научные основы сохранения и
воспроизводства ценных генотипов древесных и кустарниковых растений в культуре in vitro»**

Актуальность. Применение отобранного материала является важным условием для достижения высокого качества и мелиоративной эффективности защитных лесных насаждений в агролесомелиорации. В биотехнологии широко используется метод культивирования изолированных

тканей на искусственных питательных средах в условиях *in vitro*. Разработка и оптимизация процессов индукции и получения морфогенного каллуса играют важную роль не только в научных исследованиях, но и в промышленном растениеводстве. **Объекты исследования.** Объектом исследования была выбрана Робиния псевдоакация (*Robinia pseudoacacia* L.) и два ауксина 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) и индол-3-уксусная кислота (ИУК). **Методы исследования.** Исследование проводилось на базе ФНЦ агроэкологии РАН в лаборатории биотехнологий. В качестве эксплантов использовали сегменты листа, семядолей, гипокотыля, корня. Культивирование осуществляли в течение 4-х недель на питательной среде Murashige и Scoog (MS) дополненной ауксинами 2,4-Д и ИУК в трех разных концентрациях: 0,1 мг/л; 0,5 мг/л; 1 мг/л. Для оценки влияния условий освещения на индукцию каллусогенеза половину экспериментальных образцов культивировали в темноте, вторую половину с фотопериодом 16 часов. По окончании периода культивирования оценивались морфологические показатели (цвет, структура), индукция и средний свежий вес каллуса. **Результаты и выводы.** По результатам проведенного исследования было установлено, что *R. pseudoacacia* обладает высокой способностью к каллусогенезу, прямому и непрямому морфогенезу, а также индукция каллуса имеет прямую зависимость от концентрации ауксина. Результаты показали, что свет необходим для образования и культивирования каллуса, при культивировании в темноте потемнение каллусной ткани происходит быстрее. Для индукции и получения каллусной ткани рыхлой и среднеплотной структуры с целью дальнейшего размножения наиболее подходящими являются экспланты гипокотыля и ауксин 2,4-Д в концентрации 0,5 мг/л.

Ключевые слова: каллус, индукция каллуса, экспланты, *Robinia pseudoacacia* L.

Цитирование. Фоменко Н. Г., Жолобова О. О. Изучение факторов, влияющих на индукцию каллусогенеза у *Robinia pseudoacacia* L. в культуре *in vitro*. *Известия НВ АУК*. 2024. 3(75). 185-194. DOI: 10.32786/2071-9485-2024-03-21.

Авторский вклад. Авторы настоящего исследования принимал непосредственное участие в планировании, выполнении и анализе данного исследования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Введение. Для борьбы с опустыниванием и деградацией земель особое внимание уделяется применению защитных лесных насаждений в агросфере. Такие насаждения играют важную роль в восстановлении почвы и подавлении процессов эрозии. Они способны удерживать влагу, предотвращать вымывание плодородного слоя и защищать почву от прямого воздействия ветра и солнечных лучей.

Применение в агролесомелиорации отобранного материала является важным условием для достижения высокого качества и мелиоративной эффективности защитных лесных насаждений. Использование биотехнологических и селекционно-генетических методов позволяет ускоренно получать высококачественный семенной и посадочный материалы, повышать устойчивость деревьев к вредителям, болезням и абиотическим факторам [1].

Метод культивирования изолированных тканей на искусственных питательных средах в условиях *in vitro* широко применяется в биотехнологии. Он используется для сохранения и размножения ценных генотипов, а также для селекции и оздоровления посадочного материала. Разработка и оптимизация методов индукции и получения морфогенного каллуса важны не только для научных исследований, но и для промышленного растениеводства [2].

Каллус представляет собой интегрированную систему, которая может образовываться двумя путями: экзогенно (в результате пролиферации поверхностных клеток различных тканей растительного организма) и эндогенно (в глубине этих тканей) [3]. Калькулы каллусных тканей, полученные из эксплантов в условиях *in vitro*, могут выступать модельными объектами для изучения различных аспектов морфогенеза растений. Использование таких моделей позволяет изучить и оценить морфогенетические события, которые происходят в культивируемых *in vitro* клетках [4, 5]. Кроме того, культуры каллусных тканей можно использовать в качестве модельных объектов для получения продуктов вторичного метаболизма и создания новых форм растений, устойчивых к абиотическим и биотическим факторам окружающей среды [6].

Однако индукция и получение морфогенного каллуса – достаточно сложный процесс, требующий тщательной оптимизации условий культивирования. Необходимо учитывать особенности каждого вида растений, оптимальные концентрации регуляторов роста, питательный состав среды, а также другие факторы, влияющие на дифференциацию и развитие каллуса [2, 7, 8].

На сегодняшний день было проведено значительное количество исследований по индукции каллусогенеза у лекарственных и сельскохозяйственных растений [9, 10, 11]. И несмотря на то что в последние годы научное сообщество все больше обращает внимание на важность изучения процессов индукции каллусогенеза на древесных растениях, данный вопрос остается недостаточно исследованным.

Цель исследования – изучение особенностей каллусообразования *in vitro* у эксплантов: корень, гипокотиль, семядоли, листья *Robinia pseudoacacia* на питательных средах различного гормонального состава и условий освещения.

Материалы и методы. Исследование проводилось на базе ФНЦ агроэкологии РАН в лаборатории биотехнологий. В качестве модельного объекта была выбрана Робиния псевдоакация (*Robinia pseudoacacia* L.) которая является быстрорастущей лесообразующей древесной породой, обладающая высокими показателями засухоустойчивости и морозостойкости, а также используется для создания ветрозащитных полос и укрепления песков [12].

Поскольку для индукции каллусогенеза нежелательно использовать одревесневшие, плохо пролиферирующие и с низким уровнем метаболизма ткани [13, 14], предварительно были пророщены семена *R. pseudoacacia* в асептических условиях, чтобы получить наиболее пригодный материал для проведения исследования.

Перед введением семян скарифицировали кипятком. После полного остывания семян был использован последовательный режим стерилизации: 30-минутная промывка семян в дезинфицирующем мыльном растворе, 1-минутная обработка 70% раствором этанола (C_2H_5OH), 15-минутная выдержка в 10% растворе перекиси водорода (H_2O_2). Стерилизацию растительного материала проводили в условиях ламинар-бокса с последующей шестикратной промывкой стерильной дистиллированной водой. Простерилизованные и промытые семена помещали в баночки с питательной средой.

Питательные среды готовили по протоколу Murashige и Scoog (MS) [13], в качестве экзогенных регуляторов роста нами были выбраны два типа ауксинов: 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) и индол-3-уксусная кислота (ИУК) в трех разных концентрациях: 0,1 мг/л; 0,5 мг/л; 1 мг/л.

В качестве эксплантов использовали сегменты листа, семядолей, гипокотилей, корня. Для этого в условиях ламинар-бокса БМБ-П-«Ламинар-С»-1,2 при помощи стерильных скальпеля и пинцета отделяли части асептически выращенных растений и нарезали на фрагменты длиной примерно 0,5-1 см. Поскольку достаточно важным фактором для получения первичного каллуса является механическое повреждение тканей экспланта [15, 16], делали насечки (поранения) по всей поверхности эксплантов и помещали их в стерильную чашку Петри с питательной средой.

Культивирование проводили в течение 4-х недель при постоянной температуре 25°C и освещенности 70 мкмоль/с/м² в климатической камере роста растений TPL-500 (Testa, Россия). Для оценки влияния условий освещения на индукцию каллусогенеза, половину экспериментальных образцов культивировали в темноте, вторую половину с фотопериодом 16 часов. Исследование было проведено в трехкратной повторности.

По завершении периода культивирования оценивались морфологические показатели (цвет, структура), индукция и средний свежий вес каллуса.

Индукцию каллуса (ИК) рассчитывали по формуле [17]:

$$ИК = \frac{\text{кол} - \text{во каллуса индуцированное эксплантами}}{\text{общее кол} - \text{во инокулированных эксплантов}} * 100\%$$

Полученные данные по приросту массы каллуса статистически обрабатывали с использованием программы StatSoft Inc. (USA). Сравнение групп по количественному показателю проводилось с помощью критерия Тьюки. Полученные данные представлены в виде средней арифметической с учетом ошибки среднего. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$. Построение диаграмм осуществлялось с использованием пакета программы Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение. В результате проведенного исследования было изучено влияние различных концентраций ауксинов (2,4-Д, ИУК) и условий освещения на эффективность индукции каллусообразования на четырех типах эксплантов – корень, гипокотиль, семядоля и лист.

Анализ полученных данных показал, что все 4 типа экспланта обладают способностью к каллусообразованию. Была установлена прямая зависимость индукции калусообразования от концентрации ауксина. На питательных средах, содержащей в своем составе ИУК наблюдалось повышение процента индукции каллусогенеза при увеличении концентрации ауксина. Максимальные показатели фиксировались на концентрациях 0,5 и 1 мг/л у эксплантов корня и гипокотыля. На семядольных эксплантах индукция полностью отсутствовала на всех трех концентрациях, у листовых эксплантов незначительные образования каллуса фиксировались только у образцов, культивируемых в темноте на концентрациях 0,5 и 1 мг/л (27,8% и 39,2% соответственно). Аналогичные результаты исследований были получены у *Arachis hypogaea* L. [18] и *Guizotia abyssinica* Cass. [19] где авторы также отмечали отсутствие каллусогенеза на эксплантах семядоли и листа при культивировании на среде MS содержащей ИУК.

На питательных средах с ауксином 2,4-Д образование каллуса фиксировалось на всех исследуемых эксплантах, наименьший процент ИК наблюдался при концентрации 0,1 мг/л у эксплантов семядоли культивируемых как при свете (33,3%) так и в темноте (11,1%). Также невысокий показатель ИК был зафиксирован на листовых эксплантах при свете и составил 22,2%. Во всех остальных случаях индукция каллусообразования была высокая – от 72,5 до 100% (таблица 1). Эффективность применения ауксина 2,4-Д для индукции каллусогенеза была также подтверждена у *Gazania rigens* L. [20], *Artemisia annua* L. [21] и *Nerium oleander* L. [22].

Таблица 1 – Индукция каллусообразования у *R. pseudoacacia* в зависимости от типа экспланта, ауксина и условий освещения, %

Table 1 – Induction of callus formation in *R. pseudoacacia* depending on the type of explant, auxin and light, %

мг/л / mg/l	Корень / Root		Гипокотиль / Hypocotyl		Семядоля / Cotyledon		Лист / Leaf	
	св. / light	тм. / darkness	св. / light	тм. / darkness	св. / light	тм. / darkness	св. / light	тм. / dark- ness
2,4-Д								
0,1	89,2±10,8	86,2±9,8	100±0	87,2±8,3	33,3±4,7	11,1±7,1	22,2±11,1	72,5±14,6
0,5	100±0	100±0	100±0	100±0	89,2±10,8	78,4±10,8	78,4±11,7	75,4±10,8
1	100±0	100±0	100±0	100±0	89,2±10,8	100±0	83,8±12,2	89,2±10,8
ИУК								
0,1	55,5±22,2	57,5±21,5	57,8±13,8	62,5±14,6	0	0	0	0
0,5	67±13,2	84,2±10,8	78,4±11,2	78,4±10,8	0	0	0	27,8±14,7
1	78,4±10,8	100±0	89,2±7,8	83,3±16,7	0	0	0	39,2±20,2
Условные обозначения: св. – свет; тм. – темнота / Legend: св. – light; тм.-darkness.								

Было установлено, что прирост массы каллуса зависел от вида ауксина и его концентрации, а также от типа экспланта (рисунок 1). Прямой зависимости влияния условий культивирования установлено не было, на одних эксплантах прирост массы каллусной ткани был больше при культивировании в темноте, на других при свете.

Наибольшее нарастание массы каллуса наблюдалось на эксплантах корня и гипокотыля в присутствии ауксина 2,4-Д (0,5 и 1 мг/л). При культивировании на питательной среде с указанными концентрациями ауксина и освещения 16 часов был зафиксирован наибольший свежий вес каллуса корневого экспланта, который составил 1,16 и 0,86 г соответственно. На эксплантах гипокотыля наблюдалась обратная ситуация: максимальная масса каллуса была зафиксирована при культивировании в темноте при тех же концентрациях ауксина 2,4-Д и составила 1,28 и 1,29 г соответственно.

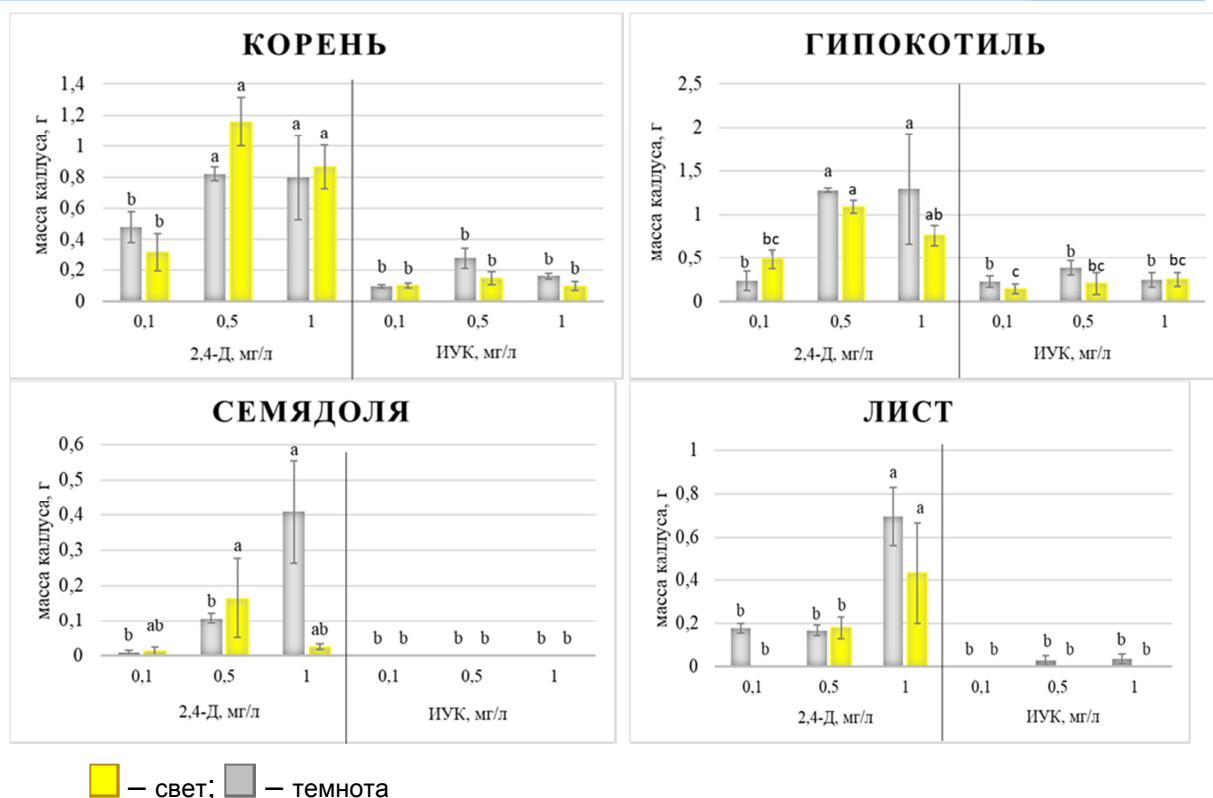


Рисунок 1 – Прирост массы каллуса на эксплантах *R. pseudoacacia*, в зависимости от ауксина и условий культивирования. Разные строчные буквы (a-c) показывают статистически значимые различия ($p < 0,05$)

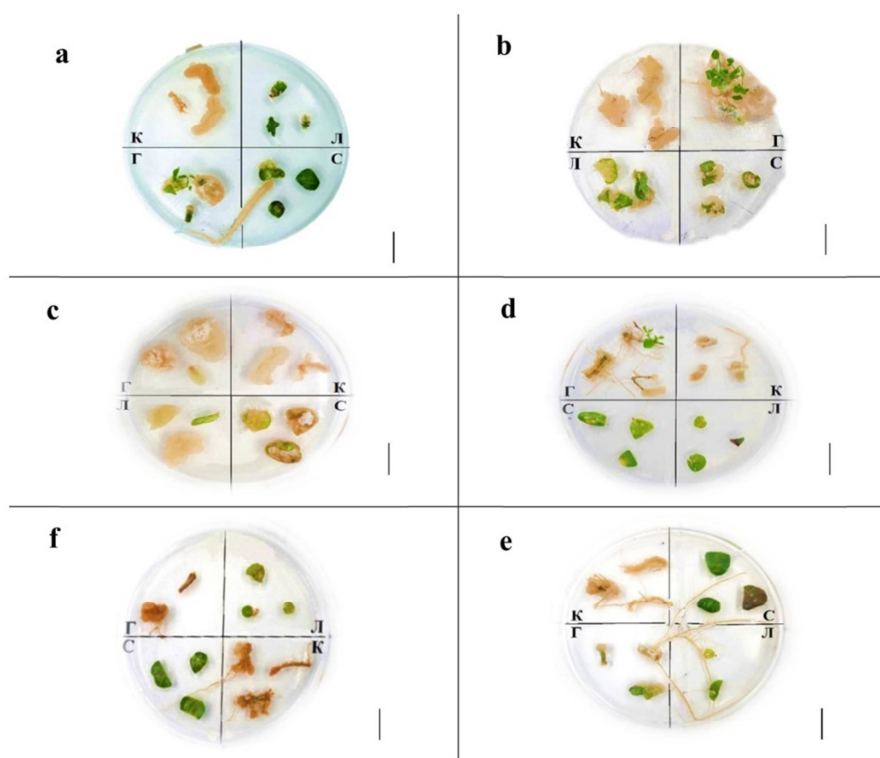
Figure 1 – Increase in callus weight on *R. pseudoacacia* explants, depending on auxin and cultivation conditions. Different lowercase letters (a-c) show statistically significant differences ($p < 0,05$)

Добавление в питательную среду ауксинов 2,4-Д 0,1 мг/л и ИУК 0,1; 0,5 и 1 мг/л не оказало существенного влияния на прирост массы каллуса эксплантов корня и гипокотыля. Средний прирост биомассы каллусных культур варьировался в пределах от 0,09 до 0,48 г.

На семядольных и листовых эксплантах отмечалась незначительная биомасса каллуса на всех исследуемых средах. Максимальные показатели были зафиксированы при культивировании в темноте на питательной среде с ауксином 2,4-Д 1 мг/л и составили 0,41 и 0,69 г соответственно. Аналогичные результаты были отмечены на листовых эксплантах *Citrus grandis* Osbeck [23].

Оценка морфологических особенностей образовавшегося каллуса проводилась на 28-30 день исследования. В процессе культивирования были получены каллусные ткани, отличавшиеся по окраске и структуре. Проведенное исследование позволило установить, что процесс потемнения каллусных культур при их культивировании в темноте происходит значительно быстрее по сравнению с образцами, выращиваемыми в присутствии света.

Также было выявлено, что на морфологическую структуру каллуса влияет концентрация ауксина. На питательных средах с низкой концентрацией ауксинов (0,1 мг/л) каллус был плотным и средней плотности (рисунок 2 а, d), с повышением концентрации ауксинов до 0,5 мг/л каллусная ткань становилась более рыхлой (рисунок 2 b), при этом на питательных средах с ИУК каллус был более темным по сравнению с другими образцами (рисунок 2 e). При самой высокой концентрации ауксинов (1 мг/л) отмечалась сильная обводненность и рыхлость каллусной ткани (рисунок 2 с, f). Закономерность влияния концентрации гормонов роста на структуру каллуса также была отмечена в исследованиях у *Actinidia deliciosa* Chev. [24] и *Citrus grandis* Osbeck [4].



Примечание: К – корень; Г – гипокотиль; С – семядоля; Л – лист. Масштаб 1 см
Note: K – root; D – hypocotyl; C – cotyledon; L – sheet. 1 cm scale

Рисунок 2 – Каллусные культуры *R. pseudoacacia* в зависимости от концентрации ауксинов:
а – 2,4-Д 0,1 мг/л; б – 2,4-Д 0,5 мг/л; в – 2,4-Д 1 мг/л; д – ИУК 0,1 мг/л; е – ИУК 0,5 мг/л; ф – ИУК 1 мг/л
Figure 2 – Callus cultures of *R. pseudoacacia* depending on the concentration of auxins:
a – 2,4-D 0,1 mg/l; b – 2,4-D 0,5 mg/l; c – 2,4-D 1 mg/l; d – IAA 0,1 mg/l; e – IAA 0,5 mg/l; f – IAA 1 mg/l

Подробное описание окраски и структуры каллусных культур *R. pseudoacacia* в зависимости от типа экспланта и ауксина, а также процент покрытия эксплантов каллусом представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Морфологические особенности каллусных культур *R. pseudoacacia* в зависимости типа экспланта и ауксина

Table 2 – Morphological features of callus cultures of *R. pseudoacacia* depending on the type of explant and auxin

Ауксин / auxin	мг/л / mg/l	Эксплант / explant	Окраска и структура каллусной ткани / Coloration and structure of callus tissue
1	2	3	4
2,4-Д	0,1	Корень ^{4*} / Root ^{4*} Гипокотиль ⁴ / Hypokotyl ⁴ Семядоля ¹ / Cotyledon Лист ² / Leaf	Светло-коричневый, плотный / Light brown, dense Светло-коричневый, ср. плотности** / Light brown, average density** Белый, ср. плотности / White, average density Белый, ср. плотности / White, average density
	0,5	Корень ⁴ / Root ^{4*} Гипокотиль ⁴ / Hypokotyl ⁴ Семядоля ² / Cotyledon Лист ¹ / Leaf	Бежевый, ср. плотности / Beige, average density Бежевый, рыхлый / Beige, loose Светло-бежевый, ср. плотности / Light beige, average density Светло-бежевый, ср. плотности / Light beige, average density
	1	Корень ⁴ / Root ^{4*} Гипокотиль ⁴ / Hypokotyl ⁴ Семядоля ¹ / Cotyledon Лист ³ / Leaf	Светло-бежевый, рыхлый / Light beige, loose Белый, рыхлый / White, loose Белый, рыхлый / White, loose Белый, рыхлый / White, loose

Окончание таблицы 2

1	2	3	4
ИУК / IAC	0,1	Корень ¹ / Root ^{1*} Гипокотиль ² / Hypokotyl ² Семядоля ⁰ / Cotyledon Лист ⁰ / Leaf	Светло-коричневый, плотный / Light brown, dense Светло-коричневый, ср. плотный / Light brown, cf. dense Каллус не образовался / Callus did not form Каллус не образовался / Callus did not form
	0,5	Корень ³ / Root ^{3*} Гипокотиль ³ / Hypokotyl ³ Семядоля ⁰ / Cotyledon Лист ¹ / Leaf	Светло-коричневый, ср. плотности / Light brown, cf. dense Бежевый, ср. плотности / Beige, average density Каллус не образовался / Callus did not form Светло-коричневый, рыхлый / Light brown, loose
	1	Корень ¹ / Root ^{1*} Гипокотиль ² / Hypokotyl ² Семядоля ⁰ / Cotyledon Лист ¹ / Leaf	Бежевый, ср. плотности / Beige, average density Бежевый, ср. плотности / Beige, average density Каллус не образовался / Callus did not form Бежевый, рыхлый / Beige, loose

Примечание: *покрытие эксплантов каллусом: 0 – 0%, 1 – 25%, 2 – 50%, 3 – 75%, 4 – 100%.

**Средней плотности / Note: *Callus coverage of explants: 0 – 0%, 1 – 25%, 2 – 50%, 3 – 75%, 4 – 100%.

**Medium density

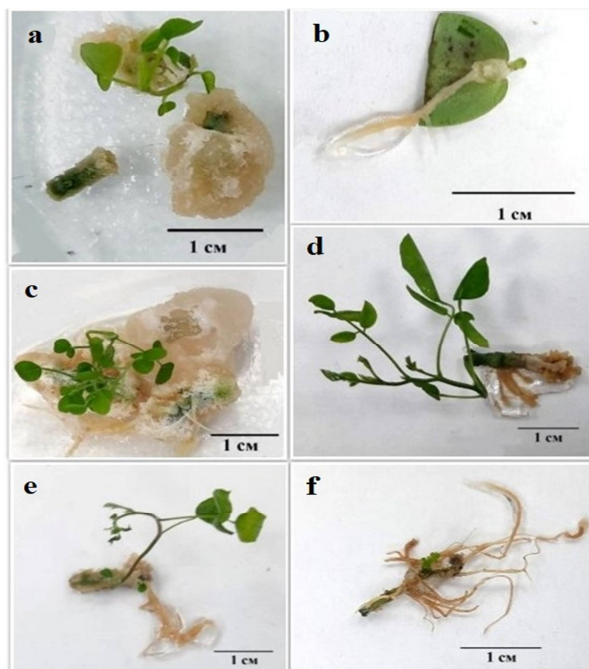


Рисунок 3 – Регенерация на эксплантатах *R. pseudoacacia*: а – регенерация побегов из каллуса на экспланте гипокотили (2,4-Д 0,1 мг/л); б – ризогенез из каллуса на экспланте семядоли (2,4-Д 0,1 мг/л); с, d – регенерация побегов и корней из каллуса на эксплантатах гипокотили (2,4-Д 0,5 мг/л и ИУК 0,5 мг/л соответственно); е, f – прямая регенерация побегов из корневых эксплантов (ИУК 0,1 и 0,5 мг/л)
Figure 3 – Regeneration on explants of *R. pseudoacacia*: а – regeneration of shoots from callus on a hypocotyl explant (2,4-D 0,1 mg/l); б – rhizogenesis from callus on a cotyledon explant (2,4-D 0,1 mg/l); с, d – regeneration of shoots and roots from callus on hypocotyl explants (2,4-D 0,5 mg/l and IAA 0,5 mg/l, respectively); е, f – direct regeneration of shoots from root explants (IAA 0,1 and 0,5 mg/l, respectively)

На питательных средах с ауксинами 2,4-Д в концентрациях 0,1 и 0,5 мг/л и ИУК 0,5 мг/л наблюдался прямой и непрямой морфогенез. В присутствии 2,4-Д 0,1 мг/л на эксплантатах гипокотили отмечалась активная регенерация побегов (рисунок 3 а), у семядольных эксплантов наблюдался ризогенез (рисунок 3 б). При увеличении концентрации ауксинов до 0,5 мг/л на гипокотильных эксплантатах происходила одновременная регенерация побегов и корней (рисунок 3 с, d). На самых высоких концентрациях (1 мг/л) ауксинов 2,4-Д и ИУК регенерирующего каллуса обнаружено не было. В присутствии ауксина ИУК 0,1 мг/л и 1 мг/л, отмечалась прямая регенерация побегов на корневых эксплантатах (рисунок 3 е, f).

Заключение. По результатам проведенных исследований было установлено, что *R. pseudoacacia* обладает способностью к каллусогенезу, прямому и непрямому морфогенезу. Кроме того, было установлено, что концентрация ауксина и тип экспланта оказывают влияние на индукцию каллуса, структуру и прирост массы каллусной ткани. Также было отмечено, что при культивировании в темноте происходит быстрое потемнение каллусной ткани.

В соответствии с полученными результатами для каллусогенеза *R. pseudoacacia* наилучшим эксплантом является гипокотиль, так как при использовании данного экспланта на всех концентрациях исследуемых ауксинов был отмечен высокий процент индукции, который колеблется от 55,5% до 100%.

Каллусы, индуцированные ауксином ИУК, проявляли низкий уровень морфогенеза, они имели также небольшой прирост каллусной массы и уплотненную структуру при низких концентрациях. Максимальный прирост каллусной ткани отмечался на питательных средах с ауксином 2,4-Д в концентрациях 0,5 и 1 мг/л. Структура каллуса при использовании 2,4-Д в концентрации 0,1 мг/л была достаточно плотной, в то время как при концентрации 1 мг/л она была рыхлой, но очень обводненной. Исходя из этого для наращивания каллусной ткани среднеплотной и рыхлой структуры с целью размножения рекомендуется использовать 2,4-Д в концентрации 0,5 мг/л и эксплант гипокотиля.

Conclusions. Based on the results of these studies, *R. pseudoacacia* was found to be capable of callusogenesis, direct and indirect morphogenesis. In addition, auxin concentration and explant type were found to influence callus induction, structure and mass gain of callus tissue. It was also observed that rapid darkening of callus tissue occurred when cultured in the dark.

According to the results obtained, the best explant for callusogenesis of *R. pseudoacacia* is the hypocotyl, because when using this explant at all concentrations of auxins tested, a high percentage of induction was observed, which ranged from 55.5% to 100%.

Callus induced by auxin IAA showed a low level of morphogenesis, they also had low callus growth and compacted structure at low concentrations. Maximum growth of callus tissue was observed on nutrient media with auxin 2,4-D at concentrations of 0.5 and 1 mg/l. The callus structure when 2,4-D was used at a concentration of 0.1 mg/l was quite dense, whereas at a concentration of 1 mg/l it was loose but very watered. On this basis, it is recommended to use 2,4-D at a concentration of 0.5 mg/l and a hypocotyl explant to develop callus tissue with a medium dense and loose structure for propagation purposes.

Библиографический список

1. Чепурной В. С., Максимцов Д. В. Практическая агролесомелиорация: Методические указания по изучению эколого-биологических особенностей и морфологических признаков древесных видов для защитного лесоразведения. Краснодар, 2016. 98 с.
2. Круглова Н. Н., Сельдимирова О. А., Зинатуллина А. Е. Каллус in vitro как модельная система для исследования стрессоустойчивости растений к абиотическим факторам (на примере злаков). Успехи современной биологии. 2018. Т. 138. № 3. С. 283-293.
3. Батыгина Т. Б., Осадчий Я. В. Выявление гомологии клеточных элементов репродуктивных и формообразовательных структур. Успехи современной биологии. 2015. Т. 135. № 4. С. 337-345.
4. Ikeuchi M., Ogawa Y., Iwase A., Sugimoto K. Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. Development. 2016. V. 143. N. 9. Pp. 1442-1451.
5. Feher A. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? Frontiers in plant science. 2019. V. 10. P. 536.
6. Нгуен Т. Х. Экспериментальный морфогенез в культуре изолированных клеток и тканей подсолнечника (*Helianthus annuus* L.). Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2007. № 2. С. 116-124.
7. Ikeuchi M., Sugimoto K., Iwase A. Plant callus: mechanisms of induction and repression. The plant cell. 2013. V. 25. N. 9. Pp. 3159-3173.
8. Colebrook E. H., Thomas S. G., Phillips A. L., Hedden P. The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. Journal of experimental biology. 2014. V. 217. N. 1. Pp. 67-75.
9. Goncharova Y. K., Kharitonov E. M., Bushman N. Y., Vereshchagina S. A. Comparative analysis of the efficiency of nutrient media for the induction of callus formation for rice hybrids. Russian agricultural sciences. 2014. V. 40. N. 1. Pp. 5-9.
10. Seldimirova O. A., Bezrukova M. V., Galin I. R., Lubyanova A. R., Shakirova F. M., Kруглова Н. Н. 24-epibrassinolide effects on in vitro callus tissue formation, growth, and regeneration in wheat varieties with contrasting drought resistance. Russian journal of plant physiology. 2017. V. 64. Pp. 919-929.
11. Khandy M. T., Kochkin D. V., Tomilova S. V., Galishev B. A., Sukhanova E. S., Klyushin A. G., et al. Obtaining and study of callus and suspension plant cell cultures of *Tribulus terrestris* L., a producer of steroidal glycosides. Applied biochemistry and microbiology. 2017. V. 53. Pp. 800-806.
12. Морозова Е. В., Изоус А. П., Крючков С. Н. Основные итоги селекции робинии лжеакакии в Нижнем Поволжье. Успехи современного естествознания. 2018. № 12 (2). С. 290-295.
13. Дитченко Т. И. Культуры растительных клеток: учебное пособие. Минск: БГУ, 2018. 96 с.
14. Breton C., Cornu D., Chriqui D., Sauvanet A., Capelli P., Germain E., Jay-Allemand C. Somatic embryogenesis, micropropagation and plant regeneration of "Early Mature" walnut trees (*Juglans regia*) that flower in vitro. Tree Physiology. 2004. V. 24. N. 4. Pp. 425-435.

15. George E. F., Debergh P. C. Micropropagation: uses and methods. Plant propagation by tissue culture. Netherlands: Springer. 2008. Pp. 29-64.
16. Ramírez-Mosqueda M. A. Somatic Embryogenesis: Methods and Protocols. Springer Nature. 2022. Pp. 1-8.
17. Abdel-Hameid A. R., Abo El-kheir Z. A., Abdel-Hady M. S., Helmy W. A. Identification of DNA variation in callus derived from *Zingiber officinale* and anticoagulation activities of ginger rhizome and callus. Bulletin of the National Research Centre. 2020. V. 44. Pp. 1-8.
18. Palanivel S., Parvathi S., Jayabalan N. Callus induction and plantlet regeneration from mature cotyledonary segments of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). Journal of Plant Biology. 2002. V. 45. Pp. 22-27.
19. Chambhare M. R., Nikam T. D. Influence of plant growth regulators on somatic embryogenesis in Niger (*Guizotia abyssinica* Cass.): an edible oilseed crop. Journal of Crop Science and Biotechnology. 2022. V. 25. N. 2. Pp. 225-232.
20. Mahood H. E., Sarropoulou V., Tzatzani T. T. Effect of explant type (leaf, stem) and 2, 4-D concentration on callus induction: Influence of elicitor type (biotic, abiotic), elicitor concentration and elicitation time on biomass growth rate and costunolide biosynthesis in gazania (*Gazania rigens*) cell suspension cultures. Bioresources and Bioprocessing. 2022. V. 9. N. 1. Pp. 1-14.
21. Dangash A., Ram M., Niranjan R., Bharillya A., Misra H., Pandya N., & Chand D. In vitro selection and hormonal regulation in cell culture of *Artemisia annua* L. Plant JSM Cell Dev Biol. 2015. V. 25. P. 26.
22. Rashmi R., Trivedi M. P. Effect of various growth hormone concentration and combination on callus induction, nature of callus and callogenic response of *Nerium odorum*. Applied biochemistry and biotechnology. 2014. V. 172. Pp. 2562-2570.
23. Tao H., Shaolin P., Gaofeng D., Shaolin P. (2002) Plant regeneration from leaf-derived callus in *Citrus grandis* (pummelo): Effects of auxins in callus induction medium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2002. V. 69. Pp. 141-146.
24. Akbaş F., Işikalan Ç., Namli S. Callus induction and plant regeneration from different explants of *Actinidia deliciosa*. Applied biochemistry and biotechnology. 2009. V. 158. Pp. 470-475.

References

1. Chepurnoy V. S., Maksimov D. V. Practical agroforestry: Guidelines for the study of ecological and biological features and morphological characteristics of tree species for protective afforestation. Krasnodar, 2016. 98 p.
2. Kruglova N. N., Seldimirova O. A., Zinatullina A. E. In vitro callus as a model system for studying plant stress resistance to abiotic factors (on the example of cereals). Advances in modern biology. 2018. T. 138. № 3. Pp. 283-293.
3. Batygina T. B., Osadchiy Y. V. Identification of homology of cellular elements of reproductive and form-forming structures. Advances in modern biology. 2015. T. 135. № 4. Pp. 337-345.
4. Ikeuchi M., Ogawa Y., Iwase A., Sugimoto K. Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. Development. 2016. V. 143. N. 9. P. 1442-1451.
5. Feher A. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? Frontiers in plant science. 2019. V. 10. P. 536.
6. Nguyen T. H. Experimental morphogenesis in the culture of isolated cells and tissues of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Proceedings of the Timiryazev Agricultural Academy. 2007. № 2. Pp. 116-124.
7. Ikeuchi M., Sugimoto K., Iwase A. Plant callus: mechanisms of induction and repression. The plant cell. 2013. V. 25. N. 9. Pp. 3159-3173.
8. Colebrook E. H., Thomas S. G., Phillips A. L., Hedden P. The role of gibberellin signaling in plant responses to abiotic stress. Journal of experimental biology. 2014. V. 217. N. 1. Pp. 67-75.
9. Goncharova Y. K., Kharitonov E. M., Bushman N. Y., Vereshchagina S. A. Comparative analysis of the efficiency of nutrient media for the induction of callus formation for rice hybrids. Russian agricultural sciences. 2014. V. 40. N. 1. Pp. 5-9.
10. Seldimirova O. A., Bezrukova M. V., Galin I. R., Lubyanova A. R., Shakirova F. M., Kruglova N. N. 24-epibrassinolide effects on in vitro callus tissue formation, growth, and regeneration in wheat varieties with contrasting drought resistance. Russian journal of plant physiology. 2017. V. 64. Pp. 919-929.
11. Khandy M. T., Kochkin D. V., Tomilova S. V., Galishev B. A., Sukhanova E. S., Klyushin A. G., et al. Obtaining and study of callus and suspension plant cell cultures of *Tribulus terrestris* L., a producer of steroidal glycosides. Applied biochemistry and microbiology. 2017. V. 53. Pp. 800-806.
12. Morozova E. V., Isos A. P., Kryuchkov S. N. Main Results of Selection of Robinia pseudoacacia in the Lower Volga Region. Advances in modern natural science. 2018. № 12 (2). Pp. 290-295.
13. Ditchenko T. I. Cultures of plant cells: a textbook. Minsk: BSU, 2018. 96 p.
14. Breton C., Cornu D., Chriqui D., Sauvanet A., Capelli P., Germain E., Jay-Allemand C. Somatic embryogenesis, micropropagation and plant regeneration of "Early Mature" walnut trees (*Juglans regia*) that flower in vitro. Tree Physiology. 2004. V. 24. N. 4. Pp. 425-435.
15. George E. F., Debergh P. C. Micropropagation: uses and methods. Plant propagation by tissue culture. Netherlands: Springer. 2008. Pp. 29-64.
16. Ramírez-Mosqueda M. A. Somatic Embryogenesis: Methods and Protocols. Springer Nature. 2022. Pp. 1-8.
17. Abd El-Hameid A. R., Abo El-kheir Z. A., Abdel-Hady M. S., & Helmy W. A. Identification of DNA variation in callus derived from *Zingiber officinale* and anticoagulation activities of ginger rhizome and callus. Bulletin of the National Research Centre. 2020. V. 44. Pp. 1-8.
18. Palanivel S., Parvathi S., Jayabalan N. Callus induction and plantlet regeneration from mature cotyledonary segments of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). Journal of Plant Biology. 2002. V. 45. Pp. 22-27.
19. Chambhare M. R., Nikam T. D. Influence of plant growth regulators on somatic embryogenesis in Niger (*Guizotia abyssinica* Cass.): an edible oilseed crop. Journal of Crop Science and Biotechnology. 2022. V. 25. N. 2. Pp. 225-232.
20. Mahood H. E., Sarropoulou V., Tzatzani T. T. Effect of explant type (leaf, stem) and 2, 4-D concentration on callus induction: Influence of elicitor type (biotic, abiotic), elicitor concentration and elicitation time on biomass growth rate and costunolide biosynthesis in gazania (*Gazania rigens*) cell suspension cultures. Bioresources and Bioprocessing. 2022. V. 9. N. 1. Pp. 1-14.

21. Dangash A., Ram M., Niranjan R., Bharillya A., Misra H., Pandya N., & Chand D. In vitro selection and hormonal regulation in cell culture of *Artemisia annua* L. Plant JSM Cell Dev Biol. 2015. V. 25. P. 26.
22. Rashmi R., Trivedi M. P. Effect of various growth hormone concentration and combination on callus induction, nature of callus and callogenic response of *Nerium odorum*. Applied biochemistry and biotechnology. 2014. V. 172. Pp. 2562-2570.
23. Tao H., Shaolin P., Gaofeng D., Shaolin P. (2002) Plant regeneration from leaf-derived callus in *Citrus grandis* (pummelo): Effects of auxins in callus induction medium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2002. V. 69. Pp. 141-146.
24. Akbaş F., Işikalan Ç., Namli S. Callus induction and plant regeneration from different explants of *Actinidia deliciosa*. Applied biochemistry and biotechnology. 2009. V. 158. Pp. 470-475.

Информация об авторах

Фоменко Надежда Геннадьевна, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории биотехнологий ФНЦ агроэкологии РАН (Российская Федерация, 400062, г. Волгоград, пр. Университетский, д. 97), ORCID 0000-0002-0783-6447, e-mail: fomenko-n@vfanc.ru

Жолобова Ольга Олеговна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией биотехнологий ФНЦ агроэкологии РАН (400062, Россия, г. Волгоград, пр. Университетский, 97), ORCID 0000-0002-1594-4181, e-mail: zholobova-o@vfanc.ru

Author's Information

Fomenko Nadezhda Gennadievna, graduate student, junior researcher at the laboratory of biotechnology of the Federal Scientific Center for Agroecology of the Russian Academy of Sciences (Russian Federation, 400062, Volgograd, Universitetsky Ave., 97), ORCID 0000-0002-0783-6447, e-mail: fomenko-n@vfanc.ru

Zholobova Olga Olegovna, candidate of biological sciences, leading researcher, head of the biotechnology laboratory of the Federal Scientific Center for Agroecology of the Russian Academy of Sciences (Russian Federation, 400062, Volgograd, Universitetsky Ave., 97), ORCID 0000-0002-1594-4181, e-mail: zholobova-o@vfanc.ru

DOI: 10.32786/2071-9485-2024-03-22

STUDY OF A WATER-RETAINING STRUCTURE FOR THE PASSAGE OF SEDIMENTS ON RECLAMATION CANALS

¹Hasan M., ²Kuznetsov Y. V.¹Aleppo University

Aleppo, Syrian Arab Republic

²Kuban State Agrarian University
Krasnodar, Russian Federation

Corresponding author E-mail: marwahasan444@gmail.com

Received 05.02.2024

Submitted 20.05.2024

Summary

Existing structures of retaining structures retain a large amount of sediment and debris, various algae at their threshold, this leads to a negative impact on the quality of irrigation water, the normal operation of pumping stations and irrigation equipment, consequently, on productivity. All of these reasons made it necessary to develop water retaining structures to improve the operation of pumping stations and increase the efficiency of irrigation systems. The passage of sediment through water retaining structures was studied in the Hydraulics Department laboratory of KubGAU on a glass tray. The percentage of sand that passed through polygonal weirs for the upper slope was calculated – 0; 1:1 and 2:1 and the angles of the side walls to its axis $\alpha = 30^\circ$, 45° , 60° and the classic weir 90° . The results of the experiments showed that the maximum percentage of sediment passage was established on a polygonal weir of a practical profile with a 2:1 upper slope and at an angle of the side walls of the weir to its axis of 30° .

Abstract

Introduction. Been studied the passage of sediments through water retention structures (polygonal weirs) for angles of 30° , 45° and 60° for the side walls of the weir and a comparison of the results with each other and the classical weir ($\alpha = 90^\circ$) when laying the upper slope was 0; 1:1 and 2:1, according to the choice of the best model among the studied models that ensure maximum passage of sediment through the weir, protection of reclamation intakes from sediment while ensuring uninterrupted water consumption for irrigation systems and also improving irrigation water by passing sediment through the weir. Materials and methods. The passage of sediment through water retaining structures was studied in the Hydraulics Department laboratory of KubGAU on a glass tray 4.4 m long; 0.17 m wide; 0.3 m high. Polygonal and classical practical weir were made of gypsum material with angles 30° , 45° , 60° and 90° of the side walls of the weir. The upstream slope weir was 0; 1:1 and 2:1, and the laying of the lower slope was constant in all experiments – 1:2. Experiments were under the following conditions: The water flow rate Q was in the range of $(0.58 \cdot 10^{-3} - 9.94 \cdot 10^{-3}) \text{ m}^3/\text{s}$, the diameter of the sediment particles was 0.1-0.25 mm, the pressure above the weir varied from $h = 1.3 \cdot 10^{-2}$ to $7.3 \cdot 10^{-2} \text{ m}$, and average water flow velocity were in the range from 0.041 to 0.409 m/s. Results and conclusion. Experimental studies of the passage of sediment through water retaining structure show that for all studied weirs, the average percentage of sand passing through a polygonal weir of a practical profile for the angles of the side walls $\alpha = 30^\circ$, 45° and 60° is 65.46%, 45.84% and 40.0% higher, respectively, compared with the classical one weir ($\alpha = 90^\circ$). Based on experimental