

ВЛИЯНИЕ ЭНДОГЕННЫХ ФИТОГОРМОНОВ НА СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ *IN VITRO* У ЯЧМЕНЯ

О.А. Сельдимирова, Н.Н. Круглова, И.Р. Галин, Д.С. Веселов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Уфимский Институт биологии Российской академии наук, Уфа, Россия, o_seldimirova@mail.ru

Аннотация. Изучено влияние концентраций эндогенных фитогормонов (ИУК, АБК и цитокининов) на соматический эмбриогенез *in vitro* в каллусах ячменя сорта Steptoe и его АБК-дефицитного мутанта AZ34. Установлено, что каллусы, способные к соматическому эмбриогенезу *in vitro*, характеризовались повышенным уровнем содержания эндогенной ИУК по отношению к другим гормонам. Показана определяющая роль баланса эндогенных ИУК и АБК в эмбриогенной способности каллусов.

Ключевые слова: ячмень *Hordeum vulgare L.*, каллус, соматический эмбриогенез *in vitro*, эндогенные фитогормоны

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1363-1366

Способность каллусов *in vitro* к регенерации растений посредством соматического эмбриогенеза в значительной степени определяет практическую значимость растительных биотехнологий. Известно, что способность каллусов к соматическому эмбриогенезу (СЭ) зависит от многих факторов, важнейший из которых – гормональный. Роль подбора оптимальных концентраций экзогенных фитогормонов в индукции СЭ и повышении эмбриогенной способности каллусов хорошо изучена [Jiménez, Thomas, 2006; Сельдимирова, Круглова, 2015; Nic-Can, Loyola-Vargas, 2016]. В то же время роль эндогенных гормонов в способности клеток каллуса дифференцироваться по пути СЭ исследована недостаточно [Jiménez, Thomas, 2006]. Высказано мнение, что компетентность клеток к СЭ в значительной степени обусловлена количеством и соотношением эндогенных регуляторов роста, однако данные об участии эндогенных фитогормонов в этих процессах весьма ограничены [Dolgikh et al., 2003; Jiménez, Thomas, 2006]. В то же время, выявление взаимосвязи между концентрациями эндогенных гормонов в клетках каллусов с их компетентностью к СЭ позволит расширить диапазон генотипов растений, клонирование которых в культуре *in vitro* основано на феномене эмбриоидогении – формировании зародышеподобных структур – эмбриоидов (соматических зародышей). В связи с этим цель работы заключалась в изучение содержания в каллусах ячменя эндогенных фитогормонов (АБК, ИУК, и цитокининов (ЦК)) и влияния соотношения их концентраций на способность каллусов к СЭ.

Материалом для исследования послужил ячмень сорта Steptoe и его АБК-дефицитный мутант AZ34. Донорные растения выращивали в полевых условиях на экспериментальных участках научного стационара Уфимского Института биологии УФИЦ РАН (Уфимский район). В качестве эксплантов для индукции каллуса использовали незрелые зародыши на 13-15 сутки после массового цветения. Для индукции каллусогенеза использовали питательную среду, содержащую макро- и микросоли и витамины по прописи Мурасиге-Скуга [Murashige, Skoog, 1962], дополненную 2.0 мг/л 2,4-Д, а также 0.5 мг/л 6-БАП и 12.5 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ или 0.5 мг/л 6-БАП, 12.5 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ и 0.5 мг/л АБК [Сельдимирова и др., 2017]. Каллусы культивировали в темноте при 26 °С в течение 4 недель. Часть каллусов для индукции СЭ переносили на среду того же состава, но без добавления регуляторов роста и культивировали при 26 °С, 16-часовом фотопериоде, освещении 16000 люкс. Постоянные препараты каллусов, подготовленные по [Световой микроскоп ..., 2013],

анализировали с использованием микроскопа проходящего света Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Germany). Оставшуюся часть каллусов анализировали на содержание эндогенных гормонов, которое определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа [Веселов, 1998]. При расчете относительного соотношения количества гормонов за единицу принимали абсолютное значение содержания в каллусах АБК. Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением программы Microsoft Office Excel 2010. В таблице представлены средние арифметические значения и ошибки средних.

Согласно данным, полученным нами ранее [Сельдимирова и др., 2017], способные к регенерации каллусы ячменя сорта Steptoe были получены при культивировании незрелых зародышей *in vitro* на среде МС, дополненной 0.5 мг/л 6-БАП и 12.5 мг/л $\text{CuSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Каллусы АБК-дефицитного мутанта ячменя AZ34, полученные на той же среде характеризовались очень низкой способностью к регенерации, которая значительно повышалась при добавлении в среду для индукции каллусогенеза 0.5 мг/л АБК. Проведенный нами гистологический анализ показал, что регенерация в каллусах ячменя сорта Steptoe осуществляется посредством СЭ (рисунок, а). В каллусах АБК-дефицитного мутанта ячменя AZ34, полученных на среде без добавления экзогенной АБК наблюдается «затухание» процесса СЭ – происходит остановка развития эмбриоидов или формирование эмбриоидов с аномальным строением (рисунок, б). Включение экзогенной АБК в среду для индукции каллусогенеза у AZ34 ведет к нормальному развитию в каллусах эмбриоидов (рисунок, в) и последующей регенерации из них растений.

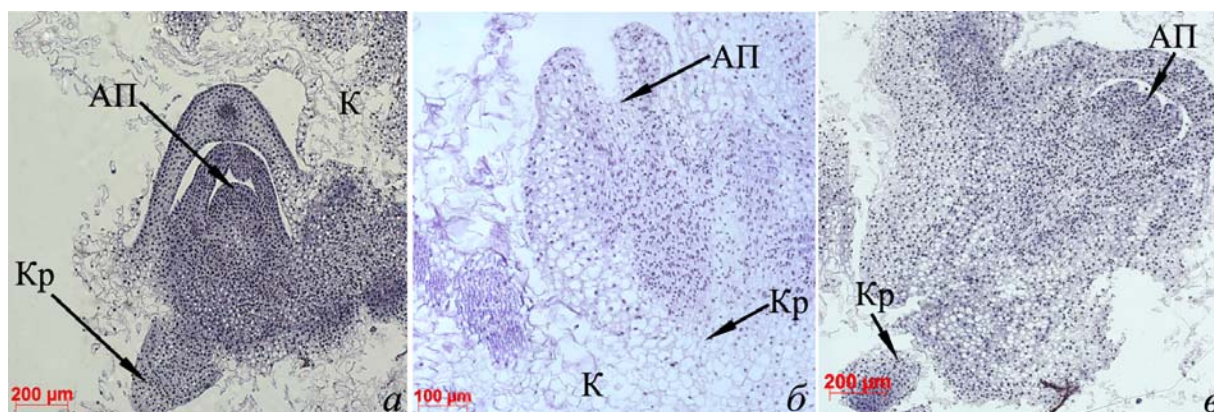


Рисунок. Эмбриониды в каллусах ячменя на 14 сутки культивирования *in vitro* на среде для индукции эмбриоидогенеза. а – сформированный эмбрионид в каллусе ячменя сорта Steptoe; б – эмбрионид в каллусе ячменя AZ34, полученном на среде без добавления экзогенной АБК (видны нарушения в развития корня и апекса побега); в – сформированный эмбрионид в каллусе ячменя AZ34, полученном на среде, дополненной экзогенной АБК. Условные обозначения: АП – апекс побега, К – каллус, Кр – корень.

Данные по содержанию эндогенных фитогормонов в каллусах ячменя приведены в таблице. Из приведенных в таблице данных видно, что ЭК ячменя сорта Steptoe характеризуются относительно высоким уровнем содержания ИУК и низкими уровнями содержания АБК и ЦК (относительное соотношение количества АБК : ИУК : ЦК составило приблизительно 1:7:3). У НЭК АБК-дефицитного мутанта ячменя AZ34, полученных при тех же условиях, что и ЭК родительской формы, но характеризующихся торможением процесса СЭ, было отмечено увеличение содержания ИУК (значительное) и ЦК по отношению к АБК (соотношение АБК : ИУК : ЦК составило приблизительно 1:22:6). ЭК AZ34, полученные на среде с добавлением

АБК, формировали полноценные эмбриониды, а относительное содержание в них АБК:ИУК:ЦК составило приблизительно 1:2:1.

Таблица.

Содержание эндогенных фитогормонов в каллусах ячменя

Тип каллуса	Содержание эндогенных фитогормонов, нг/г сырой массы			Относительное содержание эндогенных фитогормонов		
	АБК	ИУК	ЦК	АБК	ИУК	ЦК
ЭК (Step toe)	2.7±0.5	19.8±2.4	7.8±1.1	1	7.3	2.9
ЭК (AZ34)*	9.1±1.2	16.0±1.3	6.2±0.8	1	1.8	0.7
НЭК (AZ34)**	1.2±0.2	26.4±2.3	7.7±0.5	1	22	6.4

Условные обозначения: ЭК – эмбриогенный каллус, НЭК – неэмбриогенный каллус, *среда, дополненная экзогенной АБК в концентрации 0.5 мг/л, **среда без добавления экзогенной АБК

Таким образом, полученные нами данные позволяют подтвердить предположение, что ИУК – ключевой эндогенный гормон при индукции СЭ. ЭК, характеризуются более низким соотношением концентраций эндогенных ИУК:АБК по сравнению с НЭК, что совпадает с результатами, полученными другими исследователями [Dolgikh et al., 2003; Jiménez, Thomas, 2006; Zhou et al., 2017]. Такое мнение подтверждается результатами исследований [Dolgikh et al., 2003], показавшими возможность усиления эмбриогенной способности каллусов кукурузы, путем культивирования зародышей на среде для индукции каллусогенеза, содержащей ко-факторы ИУК-оксидазы – пара-кумаровую кислоту или 2,4-дихлорфенол, или в результате обработки зародышей экзогенной АБК.

Увеличение содержания ИУК и ЦК по отношению к АБК в НЭК AZ34 можно также объяснить антагонистическими взаимодействиями АБК и ауксинов/цитокининов [Sun, Li, 2014]. Кроме того, отличия в содержании эндогенной АБК в каллусах AZ34, культивируемых *in vitro* на средах с внесением и без экзогенной АБК наглядно демонстрирует важную роль эндогенной АБК в процессе СЭ, которая достаточно хорошо изучена [Alwael et al., 2017; Zhou et al., 2017 и мн. др.]. Таким образом, в условиях выполненных экспериментов эмбриогенная способность каллусов определяется балансом эндогенных ИУК и АБК. Полученные данные дают возможность искусственного повышения способности к индукции СЭ и в целом к регенерации растений в каллусной культуре *in vitro* злаков.

В работе использовано оборудование ЦКП «Агидель» УФИЦ РАН. Работа выполнена при частичной поддержке грантом РФФИ №17-04-01477.

Литература

Веселов С.Ю. Использование антител для количественного определения, очистки и локализации регуляторов роста. – Уфа: БашГУ. – 1998. – 138 с.

Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений / Н.Н. Круглова, О.В. Егорова, О.А. Сельдиминова, Д.Ю. Зайцев, А.Е. Зинатуллина. – Уфа: Гилем. – 2013. – 128 с.

Сельдиминова О.А., Круглова Н.Н. Баланс эндогенных и экзогенных гормонов и пути морфогенеза в андроклиных каллусах пшеницы *in vitro* // Известия Уфимского НЦ РАН. – 2015. – № 1. – С. 33–39.

Сельдиминова О.А., Круглова Н.Н., Веселов Д.С., Яновская А.А. Оптимизация состава питательной среды для индукции каллусообразования у ячменя сорта Step toe и его АБК-дефицитного мутанта AZ34 // Биомика. – 2017. – Т. 9, № 4. – С. 298–303.

Alwael H.A., Naik P.M., Al-Khayri J.M. Synchronization of somatic embryogenesis in

date palm suspension culture using abscisic acid // Date Palm Biotechnology Protocols: Volume I. Methods in Molecular Biology (Eds. Al-Khayri J., Jain S., Johnson D.). – Humana Press, New York, 2017. – P. 215–226.

Dolgikh Y.I., Pustovoitova T.N., Zhdanova N.E. Hormonal regulation of somatic embryogenesis on maize // Phytohormones in Plant Biotechnology and Agriculture (Eds. Macháčková I., Romanov G.A.). – Dordrecht: Springer, 2003. – P. 243–247.

Jiménez V.M., Thomas C. Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis // Somatic Embryogenesis. Plant Cell Monographs: V. 2 (Eds. Mujib A., Šamaj J.). – Berlin, Heidelberg: Springer, 2006. – P. 103–118.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // *Physiol Plant.* – 1962. – V. 15, No. 3. – P. 473–497.

Nic-Can G.I., Loyola-Vargas V.M. The role of the auxins during somatic embryogenesis // Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications (Eds. Loyola-Vargas V., Ochoa-Alejo N.). – Cham: Springer, 2016. – P. 171–182.

Sun J., Li C. Cross talk of signaling pathways between ABA and other phytohormones // *Abscisic Acid: Metabolism, Transport and Signaling* (Ed. Zhang D.P.). – Dordrecht: Springer, 2014. – P. 243–253.

Zhou X., Zheng R., Liu G., Xu Y., Zhou Y., Laux T., Zhen Y., Harding S.A., Shi J., Chen J. Desiccation treatment and endogenous IAA levels are key factors influencing high frequency somatic embryogenesis in *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook // *Front. Plant Sci.* – 2017. – V. 8. – P. 2054.

INFLUENCE OF ENDOGENOUS PHYTOGORMONOMES ON SOMATIC EMBRYOGENESIS *IN VITRO* IN BARLEY

O.A. Seldimirova, N.N. Kruglova, I.R. Galin, D.S. Veselov

Ufa Institute of Biology of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia,
o_seldimirova@mail.ru

Abstract. The influence of the balance of endogenous phytohormones (IAA, ABA and cytokinins) on somatic embryogenesis *in vitro* in barley cv. Steptoe barley and its ABA-deficient mutant AZ34 was studied. It was established that calli able of somatic embryogenesis *in vitro* were characterized by an increased level of endogenous IAA in relation to other hormones. The determining role of the balance of endogenous IAA and ABA in the embryogenic ability of calli is shown.

Keywords: *barley Hordeum vulgare L., callus, somatic embryogenesis in vitro, endogenous phytohormones*