

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ И МИКРОМИЦЕТОВ РОДА *TRICHODERMA* ДЛЯ ВЫХОДА ЭМБРИОГЕННЫХ КУЛЬТУР *LARIX SIBIRICA*

И.Н. Третьякова¹, М.Э. Пак¹, И.А. Лисецкая², А.А. Баранова³, Е.А. Рогожин^{3,4}, В.С. Садыкова³

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Институт леса им. В.Н.Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального исследовательский центр Красноярского научного центра Сибирского отделения Российской академии наук, Красноярск, Россия, culture@ksc.krasn.ru

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

³Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе, Москва, Россия

⁴Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

Аннотация. Проводили ряд экспериментов по выращиванию эмбрионных культур и регенерантов лиственницы сибирской на питательной среде АИ с различными концентрациями АМП грибов рода *Trichoderma* и белково-пептидных экстрактов следующих видов растений: щирицы запрокинутой (*Amarantus retroflexus*, семена), чернушки посевной (*Nigella sativa*, семена) и пырея удлиненного (*Elytrigia elongata*, колосья) для достижения прямого антимикробного эффекта, а также запуска механизмов индуцированной устойчивости, изучения морфогенеза и ростовой активности соматических зародышей и проростков.

Ключевые слова: *Larix sibirica*, эмбрионально-суспензорная масса, *Trichoderma*, антимикробные пептиды растений

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1392-1396

Соматический эмбриогенез является одним из перспективных направлений в создании сортового плантационного лесовыращивания. Технология соматического эмбриогенеза широко используется за рубежом в программе MVF, основанной на вводе в культуру улучшенных, генетически тестированных деревьев [Park et al., 2016]. В России биотехнология соматического эмбриогенеза была разработана нами у лиственницы сибирской в 2012 (Патент РФ № 2456344). В настоящее время у лиственницы получены длительно пролиферирующие эмбрионные клеточные линии (Кл), которые в течение 9 лет при регулярных пересадках продуцировали глобулярные зародыши от 2000 до 11000 штук на 1 г ЭСМ (эмбрионально-суспензорной массы) у разных Кл. Созревание зародышей происходило на среде АИ с АБК. Регенеранты адаптировали в ростовой камере, и затем сеянцы высаживались в теплицу и почву лесопитомника.

Для повышения выхода клонированных соматических сеянцев одним из ключевых моментов технологии соматического эмбриогенеза является получение полноценных регенерантов. В процессе морфогенеза соматических зародышей в период созревания происходит ряд нарушений в развитии доменов зародыша. Особенно часто мутации возникают в базальном домене, что выражается в образовании каллуса на месте корня, гипокотилия или в области корневой шейки [Пак и др., 2016].

Ранее нами проводились эксперименты по влиянию штаммов грибов рода *Trichoderma* в период инициации каллусных культур ряда хвойных видов [Третьякова и др., 2009]. При этом было установлено, что метаболиты штаммов способны увеличивать скорость роста каллусов и зародышей хвойных растений. Однако действие метаболита на растительный организм оказалось видоспецифично, что согласуется с данными других исследователей, показавших существенные различия по увеличению массы у разных видов и сортов злаковых растений и в ответных реакциях на воздействие отдельных видов *Trichoderma*. Стимуляция роста культур в этом случае, вероятно, связана с активацией механизма системной резистентности у растений. Кроме того, для повышения иммунитета растений к комплексу стрессовых факторов окружающей среды часто используют защитные пептиды. Большинство из них – антимикробные пептиды (АМП), которые синтезируются конститутивно и индуцировано для борьбы с патогенами и являются важнейшими эффекторными молекулами иммунной системы животных и растений. Обладая широким спектром антимикробной активности, пептиды представляют несомненный интерес для повышения устойчивости растений [Егоров, Одинцова, 2012]. В настоящее время десятки АМП выделены и охарактеризованы из семян растений, таких как ежовник обыкновенный, пшеница, чернушка посевная, звездчатка средняя и др. [Odintsova et al., 2009; Rogozhin et al., 2011; Slavokhotova et al., 2014]. Влияние АМП растительных пептидов на хвойные растения до сих пор не исследовалось.

Объектом исследования служили незрелые семена *L. sibirica*, произрастающей в дендрарии ИЛ СО РАН (дерево № 4А). Инициация эмбриогенных культур и эксперименты по созреванию и прорастанию соматических зародышей были описаны ранее [Пак и др., 2016; Третьякова и др., 2016]. Для оценки влияния активных пептидных комплексов грибов рода *Trichoderma* на эмбриогенные культуры *L. sibirica* были отобраны два штамма: *T. citrinoviride* ТУV1 4/11 ВКПМ F-1228 [запатентован как продуцент антибиотиков-пептаибиолов с антигрибной и антибактериальной активностью. Патент РФ № 2564577, 2015] и штамм 346 *T. viride*. Для эксперимента были отобраны четыре клеточные линии: Кл4, Кл5 Кл6, Кл12. Варианты среды АИ: контроль, с добавлением комплекса пептидов ТУV1 4/11 и 346 (2 мкг/диск). Для проращивания соматических зародышей лиственницы сибирской в безгормональную среду ½АИ добавляли пептиды в концентрациях 2 мкг/диск, 7 мкг/диск, 15 мкг/диск, 30 мкг/диск, 60 мкг/диск.

Для оценки влияния указанных белково-пептидных растительных экстрактов на каллусные культуры *L. sibirica* на стадии инициации (из незрелых зародышей) в питательную среду АИ вводили пептиды в диапазоне концентраций 50–1600 мкг/л. Регенеранты, полученные из длительно пролиферирующих клеточных культур – Кл4 (9 лет пролиферации) помещали на безгормональную среду ½ АИ, в которую вводили белково-пептидные экстракты, полученные из семян щиряцы, чернушки и колосьев пырея в следующих концентрациях: 25 мкг/л, 50 мкг/л, 100 мкг/л, 200 мкг/л, 400 мкг/л и 800 мкг/л. Влияние комплекса пептидов на эмбриогенные культуры *L. sibirica* оценивали по динамике пролиферации ЭСМ, морфометрии глобулярных зародышей и динамике роста регенерантов. Статистическая обработка данных проводилась по стандартным методикам [Лакин, 1973] при помощи программы Microsoft Excel 2003.

При всех вариантах обработки активными пептидными комплексами грибов рода *Trichoderma* пролиферационная активность ЭСМ сохранялась в течение всего периода культивирования на средах с добавлением пептидов (4 недели). Мультипликация зародышей продолжалась. Интенсивность роста значительно варьировала у исследуемых Кл. Высокая пролиферативная активность отмечена у Кл4 как в контрольном варианте, так и под действием АМП. У Кл12 прирост ЭСМ еще более

усиливался: при обработке АМП штамма 346 сырая масса трансплантов увеличилась в 140 раз. Низкая пролиферативная активность отмечена у Кл6, однако прослеживается такая же тенденция увеличения интенсивности прироста ЭСМ в опытных вариантах, как у Кл4 и Кл12. После перемещения пролиферирующей ЭСМ, на питательную среду АИ с АБК, кливаж, почкообразование и мультипликация эмбриональных трубок суспензора прекращались в течение 2–3 недель, как в вариантах, обработанных пептидами, так и в контроле.

Наблюдалась стимуляция корнеобразования у регенерантов Кл4 на 21 сут прорастания. В то же время происходила и стимуляции образования каллусных наплывов на проростках. Сеянцы, обработанные пептидами триходермального происхождения, не отличались от контрольных вариантов. Достоверных различий по общей длине регенерантов не выявлено. Наблюдалась тенденция увеличения длины корня у вариантов, обработанных биопептидами по сравнению с контролем, однако у части проростков наблюдалось отмирание корня и происходило каллусообразование в области корешка (рис. 1).



Рис. 1. Регенеранты Кл4 *Larix sibirica* на стадии прорастания: А, Б – контрольная среда АИ; В, Г – проростки, обработанные АМП штамма ТУV1 4/11; Д, Е – проростки, обработанные АМП штамма 346. Каллусные наплывы обозначены стрелками.

При сокультивировании эксплантов лиственницы сибирской в культуре *in vitro* с белково-пептидными растительными экстрактами щиряцы, чернушки и пырея (стадия инициации) уже через 1 мес. культивирования наблюдались отличия в росте культур и при перенесении их на среду для пролиферации и через 6 недель культивирования (3 пересадки) можно было вычленить эмбриогенные культуры, представляющие собой ЭСМ. Белая и рыхлая ЭСМ была отмечена во всех опытных вариантах. Цитологические данные показали, что в варианте с использованием экстракта щиряцы было получено 8 Кл, представляющих собой ЭСМ, в варианте с использованием экстракта было получено только 2 Кл при концентрации 100 и 200 мкг/л. Наибольшее число Кл линий в опытных вариантах было получено у пырея – 10 Кл. Таким образом, в вариантах, обработанных пептидами, было получено 18 Кл, активно формирующих ЭСМ (2 Кл некротизировались в течение двух месяцев) и 52 Кл, у которых выявлена начальная стадия образования ЭСМ (образование эмбриональных трубок). У контрольного варианта (среда АИ без пептидов) было обнаружено 5 Кл с ЭСМ и 10 Кл с начальной стадией образования эмбриогенных культур.

Исследования влияния белково-пептидных экстрактов растительного происхождения проводились на прорастающих регенерантах, полученных из длительно пролиферирующей Кл4. Для экспериментов были использованы экстракты, полученные из семян щиряцы, чернушки, а также колосьев пырея в диапазоне концентраций 25–800 мкг/л. Обработка данными вариантами не оказывала заметного влияния на рост в длину регенерантов *L. sibirica*. Повышение концентрации

биопрепаратов до 200–800 мкг/л в большинстве случаев вызывало ингибирование роста соматических проростков (рис. 2).

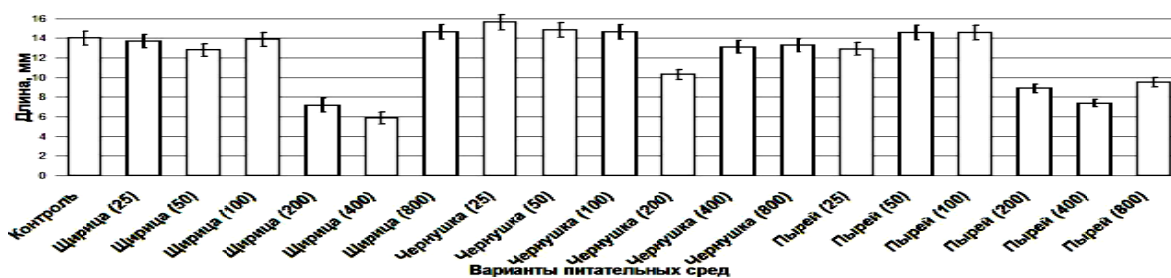


Рис. 2. Длина регенерантов *L. sibirica* на среде АИ с добавлением биопрепаратов растительного происхождения на 28 сутки культивирования.

Данный эксперимент показал, что как контрольные регенеранты, так и обработанные белково-пептидными экстрактами имеют утолщения и куллузы в области корня, гипокотилия и в области корневой шейки, как было показано нам ранее [Пак и др., 2016]. Однако ряд регенерантов формируют длинные прямые корни, такие соматические проростки способны укореняться. Дальнейшие наблюдения за ростом соматических сеянцев позволят определить устойчивость их к фитопатогенам при выращивании в теплице и в условиях лесопитомника. Разработка биотехнологии обработки антимикробными пептидами и пептидами растительного происхождения эмбрионных культур и регенерантов лиственницы *in vitro* имеет значение для решения фундаментальных и прикладных задач, изучения реализации морфогенетических программ и, особенно, для повышения иммунитета клонированных растений и устойчивости их к патогенам.

Литература

- Егоров Ц.А., Одинцова Т.И. Защитные пептиды иммунитета растений // Биоорганическая химия. – 2012. – Т. 38, № 1. – С. 7–17.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. школа, 1973. – 343 с.
- Пак М.Э., Иваницкая А.С., Двойнина Л.М., Третьякова И.Н. Эмбрионный потенциал длительно пролиферирующих клеточных линий *Larix sibirica in vitro* // Сибирский лесной журнал. – 2016. – № 1. – С. 27–38.
- Садыкова В.С., Кураков А.В., Куварина А.Е. Штамм микромицета *Trichoderma citrinoviride* Bissett ВКПМ F-1228 – продуцент мембраноактивных антибиотиков пептаиолов, обладающих антигрибной и антибактериальной активностью (патент РФ №2564577 от 07.09.2015).
- Третьякова И.Н., Пак М.Э., Иваницкая А.С., Орешкова Н.В. Особенности соматического эмбриогенеза длительно пролиферирующих эмбрионных клеточных линий *Larix sibirica in vitro* // Физиология растений. – 2016. – Т. 63. – № 6. – С. 812–822.
- Odintsova T.I., Vassilevski A.A., Slavokhotova A.A. et al. A novel antifungal hevein-type peptide from *Triticum kiharae* seeds with a unique 10-cysteine motif // FEBS J. – 2009. – V. 276, No. 15. – P. 4266–4275.
- Park Y.-S., Beaulieu J., Bousquet J. Multi-varietal forestry integrating genomic selection and somatic embryogenesis. In: Vegetative Propagation of Forest Trees (eds. Park Y.-S., Bonga JM, Moon H.-K.). – Seoul: National Institute of Forest Science (NiFos), 2016. – P. 302–22.
- Rogozhin E.A., Oshchepkova Y.I., Odintsova et al. Novel antifungal defensins from *Nigella sativa* L. seeds // Plant Physiol Biochem. – 2011. – V. 49, No. 2. – P. 131–137.

Slavokhotova A.A., Odintsova T.I., Rogozhin E.A. et al. Isolation, molecular cloning and antimicrobial activity of novel defensins from common chickweed (*Stellaria media* L.) seeds // Biochimie. – 2011. – V. 93, No. 3. – P. 450–456.

**APPLICATION OF PLANT ANTIMICROBIAL PEPTIDES
AND FUNGI-MICROMYCETES OF THE GENUS *TRICHODERMA* PEPTIDES
TO PRODUCTION EMBRYOGENIC CULTURES OF *LARIX SIBIRICA***

I.N. Tretyakova¹, M.E. Park¹, I.A. Liseckaya², A.A. Baranova³, E.A. Rogozhin^{3,4}, V.S. Sadykova³

¹V.N. Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center SB RAS", Krasnoyarsk, Russia, culture@ksc.krasn.ru

²Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

³Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia

⁴Shemyakin and Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry RAS, Moscow, Russia

Abstract. Experiments were conducted to grow embryogenic cultures and regenerants of Siberian larch on the nutrient medium AI with various concentrations of AMPs of fungi-micromycetes of the genus *Trichoderma* and plant antimicrobial peptides of the following species: *Amarantus retroflexus* (seeds), *Nigella sativa* (seeds), *Elytrigia elongata* (spikelets) to achieve a direct antimicrobial effect, as well as trigger the mechanisms of induced resistance, study morphogenesis and growth activity of somatic embryos and emblings.

Keywords: *Larix sibirica*, embryonal-suspensor mass, *Trichoderma*, plant antimicrobial peptides