



ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>


ФОРМИРОВАНИЕ ПОЯСКОВ КАСПАРИ В КОРНЯХ ПОЧТИ ИЗОГЕННЫХ ЛИНИЙ ЯЧМЕНЯ, ОТЛИЧАЮЩИХСЯ НАЛИЧИЕМ МЕЛАНИНОВОЙ ОКРАСКИ КОЛОСА

Иванов Р.С.^{1*}, Галин И.Р.¹, Ахтямова З.А.¹,
Шоева О.Ю.²

¹ Уфимский Институт биологии Уфимского федерального
исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт
цитологии и генетики Сибирского отделения Российской
академии наук, Новосибирск, Россия

*E-mail: ivanovirs@mail.ru

Изучалось влияние генов локуса BLP, контролирующих образование черной окраски чешуй колоса и перикарпа зерна на формирование поясков Каспари у растений *Hordeum vulgare* L. Эксперимент проводили с растениями сорта Bowman и тремя почти изогенными линиями, полученными на его основе: линией BLP, несущей в геноме один рекомбинантный участок от донора признака черной окраски колоса; линией с темно-серым зерном mBLP и линией со светло-серым зерном gBLP, несущей рекомбинантные участки в хромосомах 1H, 2H, 3H. Оценку отложения лигнина и суберина проводили на поперечных срезах тканей корней. Лигнин и суберин на гистологических срезах окрашивали водным раствором берберина гемисульфата. На седьмые сутки после начала прорастания на срезах, сделанных в базальной части корня, свечение берберином различий между растениями разных генотипов по уровню накопления лигнина и суберина выявлено не было. На десятые сутки на срезах базальной части корней линии gBLP заметно окрашивание радиальных стенок эндодермы, что свидетельствует об отложении лигнина в области эндодермы, характерном для формирования поясков Каспари, а также в области сосудов метаксилемы. Таким образом, выявлено, что для генотипа gBLP характерно ускоренное образование апопластных барьеров. Отобранные нами генотипы Bowman и gBLP, контрастные по скорости формирования поясков Каспари, являются удобным объектом для выявления в дальнейшем связи между скоростью формирования поясков Каспари и солеустойчивостью растений.

Ключевые слова: *Hordeum vulgare* L., ♦ мутант ♦ апопластные барьеры ♦ меланин ♦ антоциан ♦ лигнификация

Поступила в редакцию: 12.02.2024

[Цитировать | Cite as](#)

FORMATION OF CASPARIAN BANDS IN THE ROOTS OF ALMOST ISOGENIC BARLEY LINES, DIFFERENT BY THE PRESENCE OF MELANIN COLOR OF THE SPEAK

Ivanov R.S.^{1*}, Galin I.R.¹, Akhtyamova Z.A.¹,
Shoeva O.Y.²

¹ Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of
the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

² Institute of Cytology and Genetics (ICG), Siberian Branch
of Russian Academy of Sciences (SB RAS),
Novosibirsk, Russia

*E-mail: ivanovirs@mail.ru

The influence of the BLP locus genes, which control the formation of black coloration of the spike glumes and grain pericarp on the formation of Casparian bands in *Hordeum vulgare* L. plants, was studied. The experiment was carried out with plants of the Bowman variety and three almost isogenic lines obtained on its basis: the BLP line, carrying one recombinant section from the donor of the trait of black coloration of the ear; a line with a dark gray mBLP grain and a line with a light gray gBLP grain, carrying recombinant regions in chromosomes 1H, 2H, 3H. Lignin and suberin deposition were assessed on transverse sections of root tissue. Lignin and suberin on histological sections were stained with an aqueous solution of berberine hemisulfate. On the 7th day after the start of germination, on sections made in the basal part of the root, luminescence with berberine revealed no differences between plants of different genotypes in the level of accumulation of lignin and suberin. On the 10th day, on sections of the basal part of the roots of the gBLP line, staining of the radial walls of the endoderm is noticeable, which indicates the deposition of lignin in the endoderm area, characteristic of the formation of Casparian bands, as well as in the area of metaxylem vessels. Thus, it was revealed that the gBLP genotype is characterized by accelerated formation of apoplastic barriers. The Bowman and gBLP genotypes we selected, which contrast in the rate of formation of Casparian bands, are a convenient object for further identifying the relationship between the rate of formation of Casparian bands and salt tolerance of plants.

Keywords: *Hordeum vulgare* L. ♦ мутант ♦ апопластные барьеры ♦ меланин ♦ антоциан ♦ лигнификация

Принято в печать: 29.02.2024

DOI: [10.31163/2618-964X-2024-7-1-8-14](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2024-7-1-8-14) EDN: QTRDTU



ВВЕДЕНИЕ

Растения ячменя, отличающиеся окрашенными зернами и вегетативными органами, являются популярным продуктом для здорового питания благодаря антиоксидантной активности пигментов, обуславливающих их окраску: например, антоцианам и меланину (Nguyen et al., 2023). Этим их свойством обусловлены усилия исследователей, направленные на поиск генов, ответственных за проявление признака окрашенных семян и листьев (Jia et al., 2017; Glagoleva et al., 2022). Их результатом стала, в частности, идентификация гена *Blp1* (Black Lemma and Pericarp 1), контролирующего образование черной окраски чешуй колоса и перикарпа зерна ячменя за счет накопления меланина (Li et al., 2023). Сравнительный транскриптомный анализ развивающегося зерна почти изогенной линии BLP, характеризующейся наличием меланина в чешуе и в перикарпе зерновки, и её родительского сорта Bowman, зерно которого не окрашено меланином, выявил отличия в экспрессии генов, контролирующих биосинтез суберина (Glagoleva et al., 2017). А с помощью массового сегрегационного RNA-seq анализа двух групп гибридов поколения F₂, отличающихся наличием меланиновой пигментации зерна, были выявлены различия в экспрессии генов синтеза лигнина с повышенным уровнем экспрессии этих генов в группе черnozерных гибридов по сравнению с белозерными (Lui et al., 2023).

Отложение суберина и лигнина в корнях играет важную роль в формировании апопластных барьеров, защищающих растения от неконтролируемого проникновения токсичных веществ (Cui et al., 2021). В связи с этим представляло интерес сравнить формирование поясков Каспари у линий ячменя, отличающихся наличием меланиновой окраски колоса, что стало целью данных исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проводили с растениями сорта Bowman (BW) (номер в генбанке NordGen NGB 22812) и тремя почти изогенными линиями, накапливающими меланин в зерне, полученными на его основе: линией BLP (название согласно Druka et al. (2011) – BW062; NGB 20470), несущей в геноме один рекомбинантный участок от донора признака черной окраски колоса в хромосоме 1Н; линией с темно-серым зерном mBLP (BW060, NGB 20468), несущей рекомбинантные участки в хромосомах 1Н и 2Н; линией со светло-серым зерном gBLP (BW061, NGB 20469), несущей рекомбинантные участки в хромосомах 1Н, 2Н, 3Н (рис.1.). Семена были получены из генбанка NordGen (Альнарп, Швеция).

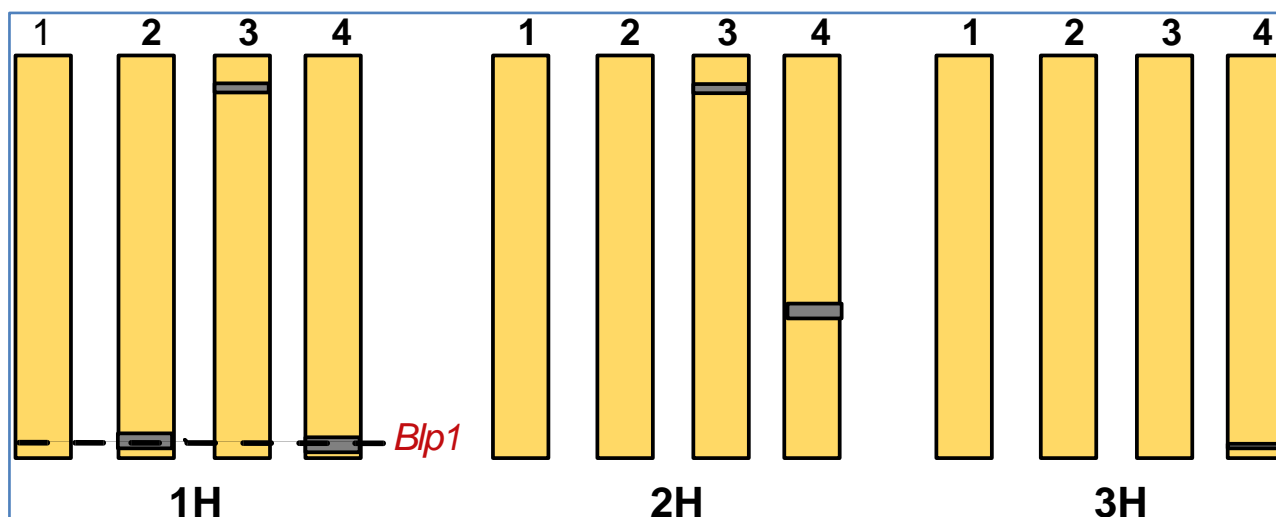


Рис. 1. Схематическое изображение хромосом ячменя сорта Bowman (1) и его почти изогенных линий BLP (2), mBLP (3) и gBLP (4). Серым цветом отмечены рекомбинантные районы, унаследованные от доноров признака черной окраски колоса, контролируемой геном *Blp1*, положение которого на хромосоме 1Н отмечено пунктирной линией. Положение рекомбинантных участков отмечено согласно данным Druka et al. (2011)

Перед проращиванием семена стерилизовали в 2% растворе гипохлорита натрия в течение 10 мин, тщательно промывали и выдерживали в стакане с водопроводной водой при интенсивной аэрации в течение 2 ч. Затем семена раскладывали на стеклянных плотиках, плавающих на 10 процентом растворе Хогланда-Арнона, и выдерживали один день темноте при комнатной температуре. Далее поддон с проростками выставляли на светоплощадку с 14-часовым фотопериодом, освещенностью $400 \text{ мкмоль м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ФАР и 25/20 °С (день/ночь). На 7 и 10 сутки выращивания растений отбирали образцы тканей корня на удалении 3-4 см от его кончика и из его базальной части для определения отложения лигнина и суберина.

Определение отложения лигнина и суберина

Оценку отложения лигнина и суберина проводили на поперечных срезах тканей корней. Срезы были получены вручную с помощью острого лезвия. Лигнин и суберин на гистологических срезах окрашивали водным раствором берберина гемисульфата (0.1% масс./об.) в течение 1 ч. Для усиления флуоресценции срезы докрашивали толуидиновым синим (0.05% масс./об.) 15 мин и промывали дистиллированной водой. Далее на срезы наносили 50% глицерин и накрывали покровным стеклом. Флуоресценцию берберина анализировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Olympus FluoView FV3000 (Olympus, Токио, Япония) (длины волн возбуждения и эмиссии: 488 нм и 520 нм, соответственно).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рисунке 2 представлены окрашенные берберинном поперечные срезы базальной части корней семисуточных растений ячменя.

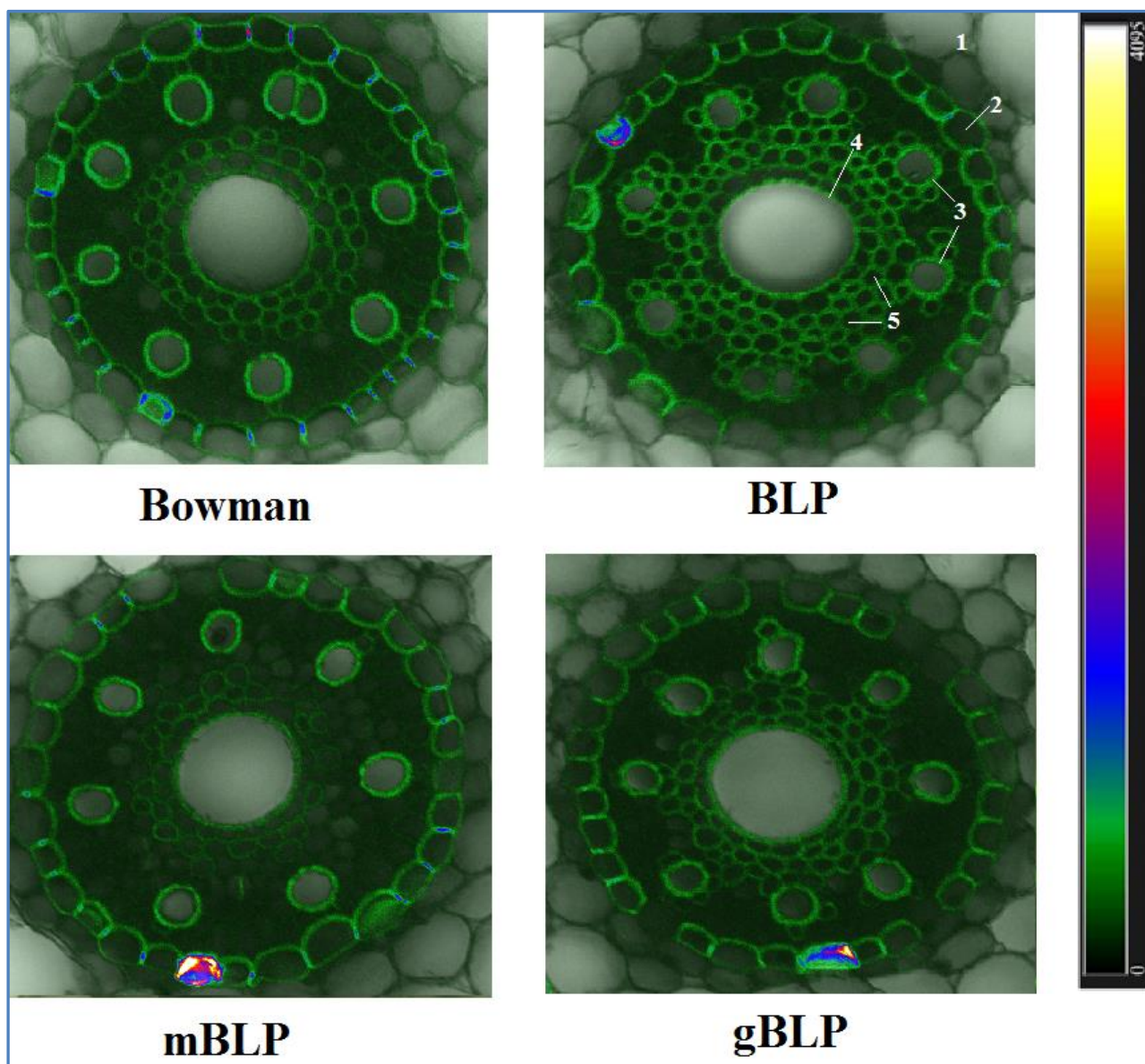


Рис. 2. Окрашенный берберинем центральный цилиндр на поперечных срезах корней 7-дневных растений ячменя исходного сорта (Bowman) и почти изогенных линий с инсерцией в 1Н хромосому. Интенсивность свечения берберина закодирована цветом: зеленый соответствует слабому свечению, а переход к синему-красному и желтому отражает его усиление. Цифрами обозначены: 1 – кора; 2 – эндодерма; 3 – метаксилема; 4 – центральная метаксилема; 5 – паренхима.

Как видно из рисунка 2, свечение берберина в центральном цилиндре срезов корней семидневных растений было слабым, что свидетельствует о низком уровне отложения лигнина и суберина в апопласте клеток. Различий между растениями разных генотипов по уровню накопления лигнина и суберина выявлено не было. На десятые сутки после начала прорастания на срезах, сделанных на расстоянии 3-4 см от кончиков корней, свечение берберинем также было низким и примерно одинаковым у растений всех изученных генотипов (данные не представлены). К этому сроку картина менялась в базальной части корней (рис.3.).

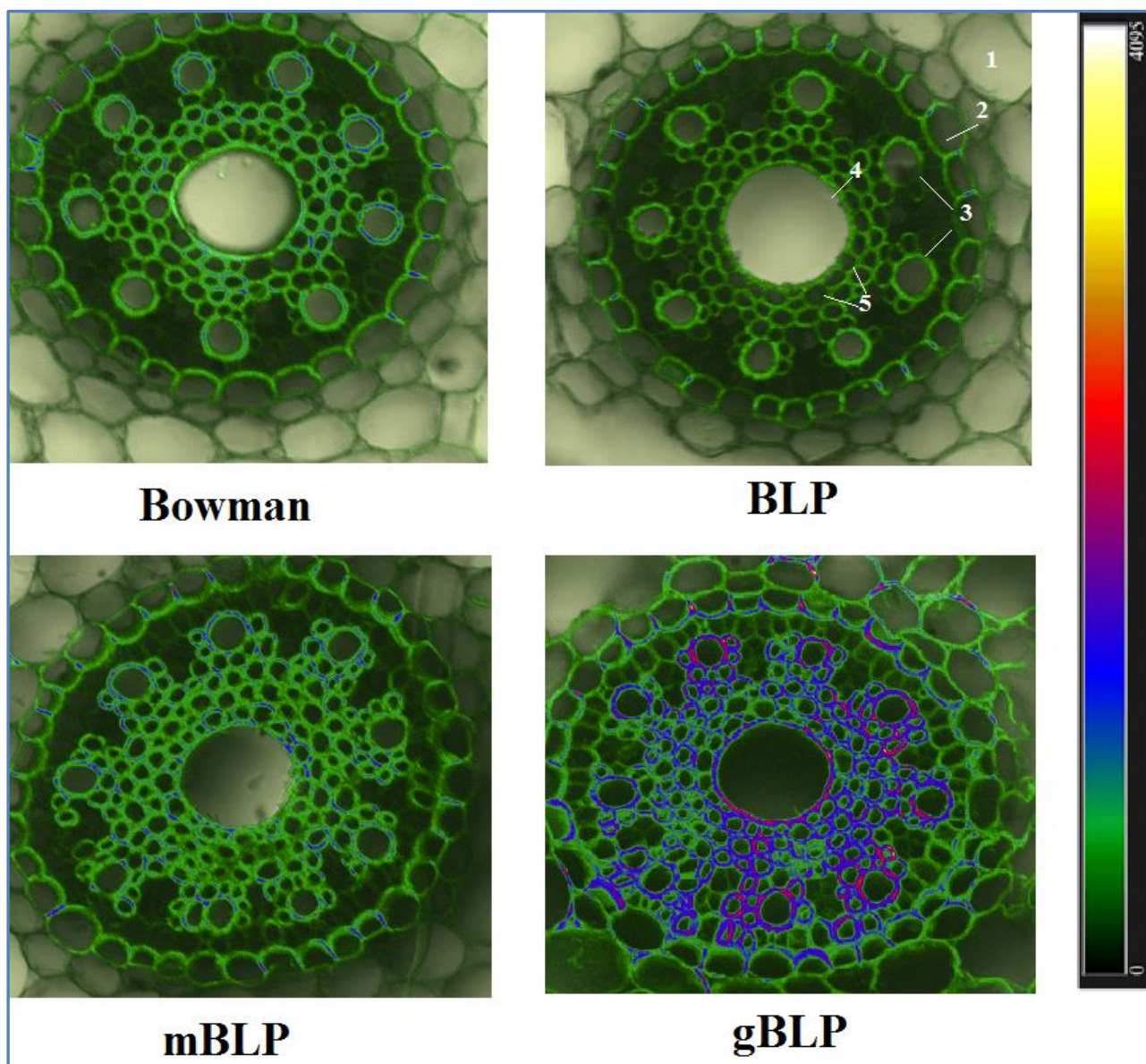


Рис. 3. Окрашенный берберинем центральный цилиндр на поперечных срезах 10-дневных растений ячменя исходного сорта (Bowman) и почти изогенных линий с инсерцией в 1Н хромосому. Интенсивность свечения берберина закодирована цветом: зеленый соответствует слабому свечению, а переход к синему-красному и желтому отражает его усиление. Цифрами обозначены: 1 – кора; 2 – эндодерма; 3 – метаксилема; 4 – центральная метаксилема; 5 – паренхима.

На срезах базальной части корней линии gBLP заметно окрашивание синим и местами красным радиальных стенок эндодермы, что свидетельствует об отложении лигнина в области эндодермы, характерном для формирования поясков Каспари. Также окрашивание синим соответствует более интенсивному свечению в области стенок сосудов, что говорит об их лигнификации.

ОБСУЖДЕНИЕ

Судя по этим результатам, у растений линии gBLP формирование поясков Каспари происходило быстрее, чем у растений остальных генотипов, что соответствует данным литературы о накоплении лигнина в корнях растений с фенотипом темного зерна (Choo et al.,

2005). Остается неясным, почему растения двух других чернозерных линий не отличались от исходного сорта по скорости формирования поясков Каспари. Возможно, выявленные различия не связаны с геном *Blp1*, а обусловлены генами, привнесёнными в геномы изучаемых линий в составе рекомбинантных участков от доноров признака черной окраски колоса (рис. 1). Так, согласно данным Druka et al. (2011), линия gBLP имеет уникальные рекомбинантные районы на хромосомах 2Н и 3Н по сравнению с другими чернозерными линиями. Возможно, именно эти участки, содержат гены, обуславливающие наблюдаемые отличия в скорости формирования поясков Каспари. Выяснение этого вопроса – задача будущего. Тем не менее, в результате проделанной нами работы мы отобрали генотип, для которого было характерно ускоренное формирование апопластных барьеров.

Ранее нами было показано, что ускоренное формирование апопластных барьеров в корнях растений ячменя под влиянием введения в их ризосферу бактерий *Bacillus subtilis* IB-22 и *Pseudomonas mandelii* IB-Ki14, стимулирующих рост растений, снижает поступление в растения токсичных ионов натрия и поддерживает рост растений на фоне засоления (Martynenko et al., 2022). Отобранные нами генотипы, контрастные по скорости формирования поясков Каспари, являются удобным объектом для выявления в дальнейшем связи между скоростью формирования поясков Каспари и солеустойчивостью растений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Choo T.M., Vigier B., Ho K.M., Ceccarelli S., Grando S., Franckowiak J.D. Comparison of black, purple, and yellow barleys // *Genet. Resour. Crop Evol.* 2005. V. 52. P. 121–126. DOI: [10.1007/s10722-003-3086-4](https://doi.org/10.1007/s10722-003-3086-4).
2. Cui B., Liu R., Flowers T.J., Song J. Casparian bands and suberin lamellae: Key targets for breeding salt tolerant crops? // *Environ. Exp. Bot.* 2021. V. 191. P. 104600. DOI: [10.1016/j.envexpbot.2021.104600](https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104600).
3. Druka A., Franckowiak J., Lundqvist U. et al. Genetic dissection of barley morphology and development // *Plant Physiol.* 2011. V. 155. P. 617–627. DOI: [10.1104/pp.110.166249](https://doi.org/10.1104/pp.110.166249).
4. Glagoleva A.Y., Shmakov N.A., Shoeva O.Y. et al. Metabolic pathways and genes identified by RNA-seq analysis of barley near-isogenic lines differing by allelic state of the Black lemma and pericarp (*Blp*) gene // *BMC Plant Biol.* 2017. V. 14. P. 182. DOI: [10.1186/s12870-017-1124-1](https://doi.org/10.1186/s12870-017-1124-1).
5. Glagoleva A.Y., Vikhorev A.V., Shmakov N.A. et al. Features of Activity of the Phenylpropanoid Biosynthesis Pathway in Melanin-Accumulating Barley Grains // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13. P. 923717. DOI: [10.3389/fpls.2022.923717](https://doi.org/10.3389/fpls.2022.923717).
6. Jia Q., Wang J., Zhu J. et al. Toward Identification of Black Lemma and Pericarp Gene *Blp1* in Barley Combining Bulk Segregant Analysis and Specific-Locus Amplified Fragment Sequencing // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. P. 1414. DOI: [10.3389/fpls.2017.01414](https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01414).
7. Li B., Jia Y., Xu L. et al. Transcriptional convergence after repeated duplication of an amino acid transporter gene leads to the independent emergence of the black husk/pericarp trait in barley and rice // *Plant Biotechnol. J.* 2023. DOI: [10.1111/pbi.14264](https://doi.org/10.1111/pbi.14264).

8. Liu Y., Chen P, Li W. et al. Conjunctive Analyses of BSA-Seq and BSR-Seq to Identify Candidate Genes Controlling the Black Lemma and Pericarp Trait in Barley // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. P. 9473. DOI: [10.3390/ijms24119473](https://doi.org/10.3390/ijms24119473).
9. Martynenko E.; Arkhipova T.; Safronova V. et al. Effects of phytohormone-producing rhizobacteria on casparian band formation, ion homeostasis and salt tolerance of durum wheat // *Biomolecules.* 2022. V. 12. P. 230. DOI: [10.3390/biom12020230](https://doi.org/10.3390/biom12020230).
10. Nguyen, D.H.H.; El-Ramady, H.; Llanaj, X.; Törös, G.; Hajdú, P.; Prokisch, J. Chemical Composition and Health Attributes of Agri-Foods: A Scientific Overview on Black Foods // *Sustainability.* 2023. V. 15. P. 3852. DOI: [10.3390/su15043852](https://doi.org/10.3390/su15043852).
11. Shoeva O.Y., Kukoeva T.V., Khlestkina E.K. et al. Regulation of the flavonoid biosynthesis pathway genes in purple and black grains of *Hordeum vulgare* // *PLoS ONE.* 2016. V. 11(10). P. e0163782. DOI: [10.1371/journal.pone.0163782](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163782).

Цитировать как

Иванов Р.С., Галин И.Р., Ахтямова З.А., Шоева О.Ю. Формирование поясков Каспари в корнях почти изогенных линий ячменя, отличающихся наличием меланиновой окраски колоса // *Экобиотех*, 2024, Т. 7 № 1. С. 8-14. DOI: [10.31163/2618-964X-2024-7-1-8-14](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2024-7-1-8-14) EDN: QTRDTU

Cited as

Ivanov R.S., Galin I.R., Akhtyamova Z.A., Shoeva O.Y. Formation of Casparian bands in the roots of almost isogenic barley lines, different by the presence of melanin color of the speak. *Ėkobioteh.* 2024, V. 7 (1). P. 8-14. DOI: [10.31163/2618-964X-2024-7-1-8-14](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2024-7-1-8-14) EDN: QTRDTU (In Rus.)