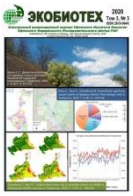
ЭКОБИОТЕХ
ISSN 2618-964X http://ecobiotech-journal.ru



МОДЕЛЬНАЯ СИСТЕМА “ЗАРОДЫШ-КАЛЛУС-РЕГЕНЕРАНТ” ПШЕНИЦЫ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКИ ДЕЙСТВИЯ 24-ЭПИБРАССИНОЛИДА

Круглова Н.Н.*[1], Сельдимирова О.А.[1], Безрукова М.В.[2], Шакирова Ф.М.[2]

[1] Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа
[2] Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа
*E-mail: kruglova@anrb.ru

Изучено влияние 24-эпибрассинолида на эффективность формирования регенерантов, полученных из зародышевых каллусов пшеницы контрастных по засухоустойчивости сортов. Показана перспективность использования экспериментальной модельной системы «незрелый зародыш – зародышевый каллус – регенерант» в экспресс-оценке действия антистрессовых регуляторов роста растений.

Ключевые слова: зародыш, каллус, регенерант, 24-эпибрассинолид, биотехнология растений, пшеница

MODEL SYSTEM “EMBRYO-CALLUS-REGENERANT” IN WHEAT FOR THE RAPID ASSESSMENT OF THE EFFECT OF 24-EPIBRASSINOLIDE

Kruglova N.N.*[1], Seldimirova O.A.[1], Bezrukova M.V.[2], Shakirova F.M.[2]

[1] Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa
[2] Institute of Biochemistry and Genetics of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences Ufa
*E-mail: kruglova@anrb.ru

The influence of 24-epibrassinolide on the efficiency of regenerants obtained from embryonic calli formation was studied in wheat cultivars contrast for drought resistance. The perspectivity of using the experimental model system «immature embryo – embryonic callus – regenerant» in the rapid assessment of the effect of antistress plant growth regulators is shown.

Keywords: embryo, callus, regenerant, 24-epibrassinolide, plant biotechnology, wheat

Поступила в редакцию: 8.09.2020

DOI: 10.31163/2618-964X-2020-3-3-331-336

ВВЕДЕНИЕ

Каллусы *in vitro* рассматриваются как перспективные экспериментальные системы при исследования различных аспектов биотехнологии растений (Круглова, Сельдимирова, 2011; Основы биотехнологии…, 2017; Сельдимирова и др., 2018). Отдельное направление таких исследований – использование каллусов в качестве тест-систем при оценке стресс-устойчивости растений (Круглова и др., 2018а,б; Kruglova et al., 2018a,b; Зинатуллина, 2020). Важно, однако, в такие системы включать и полученные из каллусов регенеранты – конечную цель биотехнологий.

В данной работе анализируется перспективность использования как регенерантных каллусов, так и регенерантов в единой модельной системе (Круглова и др., 2019б) при экспресс-оценке действия антистрессовых регуляторов роста растений.

В такой экспресс-оценке, на наш взгляд, принципиально важно использование каллусов, полученных из зародышей. Действительно, в зародышах отражен весь морфогенетический потенциал взрослого растения (Батыгина, 2014; Круглова, 2019; Круглова и др., 2019в, 2020; Kruglova et al., 2020a,b), и их использование вместо обычных в биотехнологической практике зрелых семян дает значительный выигрыш во времени. Особенно важно использовать в качестве эксплантов незрелые зародыши, представленные, например, по нашим гистологическим данным для пшеницы, способными к морфогенезу

плюрипотентными меристематическими клетками (Круглова, 2019; Круглова и др., 2019а; Круглова, Сельдимирова, 2020).

Перспективное направление таких исследований – оценка в тест-системе «незрелый зародыш – зародышевый каллус – регенерант» засухоустойчивого действия гормонов (Круглова, Никонов, 2012; Круглова и др., 2019г), поскольку именно засуха – один из наиболее распространенных негативных факторов среды. Большое внимание в этой связи мы уделяем гормону 24-эпибрассинолид (24-ЭБ), проявившему протекторные свойства при исследовании засухоустойчивости пшеницы (Shakirova et al., 2016).

Ранее нами (Сельдимирова и др., 2017; Seldimirova et al., 2017) были получены данные о влиянии внесения 24-ЭБ в индукционную среду на формирование из незрелых зародышей у устойчивого и не устойчивого к засухе сортов пшеницы зародышевых каллусов, ростовые показатели каллусов, содержание в них АБК и цитокининов, их морфо- и гистологические параметры, а также регенерационную способность. Было установлено, что устойчивый сорт характеризовался существенно большей частотой образования каллусов, более высоким приростом сырой и сухой массы, повышенным содержанием эндогенных цитокининов, а также большим количеством инициальных морфогенетических очагов в каллусах; у этого сорта отмечены и максимальные показатели способности к регенерации и формированию регенерантов одним каллусом. В то же время важно выявить влияние 24-ЭБ не только на формирование и свойства зародышевых каллусов, но и проанализировать влияние этого гормона на регенеранты, развивающиеся на регенерационной среде.

Цель данной работы – выявить влияние 24-ЭБ на эффективность формирования регенерантов из зародышевых каллусов у контрастных по засухоустойчивости сортов пшеницы и сделать обобщение о перспективности использования экспериментальной модельной системы «незрелый зародыш – зародышевый каллус – регенерант» в экспресс-оценке действия антистрессовых регуляторов роста растений.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования послужили зародышевые каллусы и полученные из них регенеранты пшеницы засухоустойчивого сорта Башкирская 26 (Б 26) (селекция БНИИ СХ УФИЦ РАН, г. Уфа) и не устойчивого к засухе сорта Салават Юлаев (СЮ) (селекция БГАУ, г. Уфа).

Использовали методы исследования, подробно изложенные в работе (Сельдимирова и др., 2017). Через 30 сут культивирования на индукционной среде (состав среды приведен в вышеуказанной работе) зародышевые каллусы переносили на регенерационную среду, составленную по прописи Мурасиге-Скуга (МС): 1) вариант, содержащий 0.2 мг/л ИУК и 0.2 мг/л кинетина, и 2) вариант, в котором кинетин заменен на 24-ЭБ в концентрации 0.2 мг/л. Каллусы культивировали в течение 25-28 сут до формирования из них растений-регенерантов в фенофазе кущения.

Статистическую обработку полученных результатов вели с применением программы Microsoft Office Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оба исследованных сорта пшеницы в условиях выполненных экспериментов формировали только регенерантные каллусы. Это свидетельствует о перспективности сортов пшеницы Б 26 и СЮ в биотехнологических исследованиях.

Максимальная регенерационная способность каллусов у обоих сортов (85.5% у СЮ и 95.6% у Б 26) отмечена при культивировании каллусов на среде в варианте 2: ИУК (0.2 мг/л) с добавлением 24-ЭБ (0.2 мг/л). С этим результатом совпадала и эффективность формирования регенерантов одним каллусом (8.9% у СЮ и 13.1% у Б 26).

Известно, что ключевые гормоны, способствующие формированию регенерантов – это цитокинины (ЦК), участвующие в формировании в каллусе морфогенетических очагов и регенерации из них побегов, и АБК – гормон стресса, роль которого велика в условиях культуры *in vitro*, когда среды содержат нефизиологические концентрации гормонов и других компонентов (Seldimirova et al., 2016a, 2019a,b; обзоры: Seldimirova et al., 2016b; Круглова и др., 2017, 2018в). Поэтому следующий этап работы был посвящен оценке содержания эндогенных гормонов в регенерантах, полученных на различных вариантах регенерационной среды (рис. 1, 2).

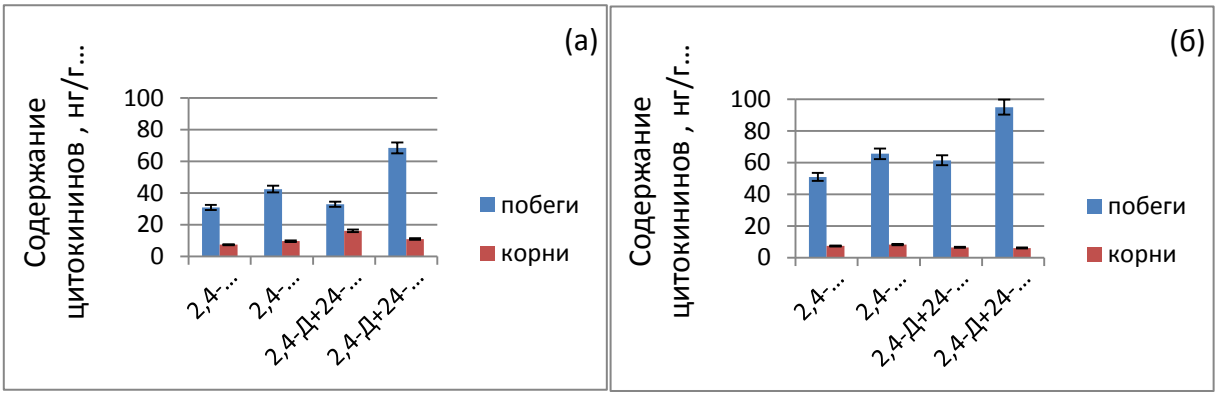


Рис. 1. Содержание цитокининов в регенерантах сортов СЮ (а) и Б 26 (б).

Согласно рис. 1, содержание ЦК в корнях регенерантов обоих сортов на всех вариантах сред сопоставимо, тогда как в побегах устойчивого сорта Б 26 содержание ЦК выше, чем у неустойчивого сорта СЮ. Это может быть связано с более интенсивными ростообразовательными процессами у Б 26, приводящими к более высокой частоте регенерации. Кроме того, у обоих сортов содержание ЦК выше на варианте регенерационной среды, дополненной 24-ЭБ, что может быть обусловлено усилением синтеза эндогенных ЦК под действием 24-ЭБ, как это было выявлено нами для этих сортов пшеницы ранее (Сельдимирова и др., 2017; Seldimirova et al., 2017).

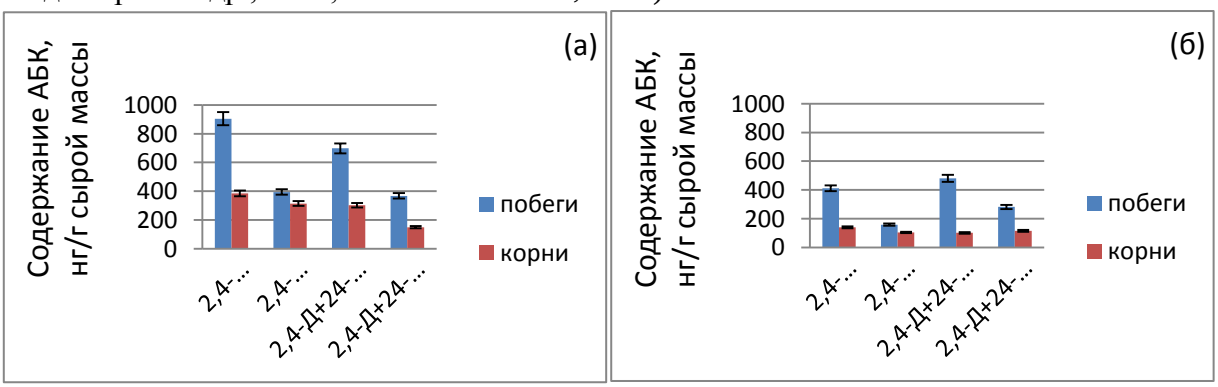


Рис. 2. Содержание АБК в регенерантах сортов СЮ (а) и Б 26 (б).

Как видно из рис. 2, содержание АБК и в побегах, и в корнях регенерантов неустойчивого сорта СЮ значительно выше, чем устойчивого сорта Б 26. Эти результаты согласуются с данными о том, что засухоустойчивость сортов можно прогнозировать по содержанию эндогенной АБК (Веселов и др., 2011). Кроме того, содержание АБК в регенерантах, полученных на регенерационной среде, дополненной 24-ЭБ, ниже, чем на

среде, дополненной кинетином. Это соответствует данным о снижении уровня эндогенной АБК под воздействием 24-ЭБ, полученным нами для пшеницы этих сортов ранее (Сельдимирова и др., 2017; Seldimirova et al., 2017). Также известно, что в условиях *in vivo* и *in situ* АБК активирует ферменты, катализирующие распад ЦК, и ингибирует экспрессию генов биосинтеза ЦК, что, в свою очередь, приводит к снижению активности клеточных делений и торможению ростовых процессов (обзор: Веселов и др., 2017).

Результаты исследования подтверждают ранее сделанный вывод (Сельдимирова и др., 2017; Seldimirova et al., 2017) о том, что 24-ЭБ может с успехом использоваться в качестве заменителя ЦК при приготовлении сред для получения регенерантов пшеницы, а исследованные сорта пшеницы перспективны для создания различных модельных тест-систем *in vitro*.

Стресс-устойчивость пшеницы к абиотическим факторам – сложный процесс, поэтому так перспективны разработки модельных экспериментальных систем для исследования различных аспектов этой проблемы. В данной и ранее опубликованных работах авторов (Сельдимирова и др., 2017; Seldimirova et al., 2017) на примере контрастных по засухоустойчивости сортов пшеницы дана оценка действия антистрессового регулятора роста растений 24-ЭБ в экспериментальной системе «незрелый зародыш – зародышевый каллус – регенерант». Использование в данной системе именно незрелых зародышей, представленных главным образом меристематическими клетками (Круглова и др., 2019а, 2020) позволяет, согласно нашей оценке, сократить время выявления действия 24-ЭБ минимум на 15 сут в сравнении с использованием в качестве эксплантов зрелых зародышей/зерновок и тем более побегов пшеницы. В целом, экспериментальную систему «незрелый зародыш – зародышевый каллус – регенерант» можно расценивать как перспективную в экспресс-оценке действия экологически безопасных антистрессовых регуляторов роста растений.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность проф. В.А. Хрипачу (Институт биоорганической химии НАН Беларуси) за любезно предоставленный препарат 24-эпибрассинолида.

В ходе исследований использована приборная база ЦКП «Агидель» УФИЦ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А18-118022190099-6.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Батыгина Т.Б. Биология развития растений. Симфония жизни. СПб.: Изд-во ДЕАН, 2014. 764 с.
2. Веселов Д.С., Кудоярова Г.Р., Кудрякова Н.В., Кузнецов В.В. Роль цитокининов в стресс-устойчивости растений // Физиология растений. 2017. Т. 64. № 1. С. 19–32. DOI: 10.7868/S001533031701016X
3. Веселов С.Ю., Шарипова Г.В., Тимергалин М.Д. Прогноз засухоустойчивости по содержанию абсцизовой кислоты и изучение возможности упрощения процедуры ее количественной оценки в растениях пшеницы // Известия Самарского научного центра РАН. 2011. Т. 13. №5(3). С. 17–20.

4. Зинатуллина А.Е. Модельная система «зародыш-зародышевый каллус» в экспресс-оценке стрессовых и антистрессовых воздействий (на примере злаков) // Экобиотех. 2020. Т. 3. № 1. С. 38-50. DOI: 10.31163/2618-964X-2020-3-1-38-50
5. Круглова Н.Н. Органогенез злаков на ранних этапах онтогенеза *in vivo* как структурная основа экспериментальных исследований *in vitro* // Экобиотех. 2019. Т. 2. № 1. С. 36–50. DOI: 10.31163/2618-964X-2019-2-1-36-50
6. Круглова Н.Н., Никонов В.И. Оценка экспланта для биотехнологических разработок в целях адаптационной селекции яровой мягкой пшеницы в засушливых условиях Южного Урала // Известия Уфимского научного центра РАН. 2012. № 3. С. 15–18.
7. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*: цито-гистологические аспекты. Уфа: Гилем, 2011. 124 с.
8. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Система «зародыш *in planta*–каллус *in vitro*»: цитофизиологические аспекты (на примере пшеницы) // Биомика. 2020. Т. 12. № 2. С. 180–189. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-8
9. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Веселов Д.С. К вопросу об участии ауксинов в индукции и регуляции морфогенеза в модельной каллусной системе *in vitro* (на примере злаков) // Биомика. 2017. Т. 9. № 4. С. 289-297.
10. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е. Каллус *in vitro* как модельная система для исследования стресс-устойчивости растений к абиотическим факторам (на примере злаков) // Успехи современной биологии. 2018а. Т. 138. № 3. С. 283-293. DOI: 10.7868/S0042132418030067
11. Круглова Н.Н., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А. Каллусогенез как путь морфогенеза *in vitro* у злаков // Онтогенез. 2018б. Т. 49. № 5. С. 273-288. DOI: 10.1134/S0475145018050038
12. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е., Веселов Д.С. Абсцизовая кислота в системах культуры *in vitro* эксплантов // Известия Уфимского научного центра РАН. 2018в. № 2. С. 55–60. DOI: 10.31040/2222-8349-2018-0-2-55-60
13. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е. Гистологический статус зародыша пшеницы в стадии органогенеза *in vivo*, оптимальной для получения морфогенного каллуса *in vitro* // Известия Уфимского научного центра РАН. 2019а. № 1. С. 25–29. DOI: 10.31040/2222-8349-2019-0-1-25-29
14. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е. Каллус *in vitro* как модельная система для изучения органогенеза растений // Известия Уфимского научного центра РАН. 2019б. № 2. С. 44–54. DOI: 10.31040/2222-8349-2019-0-2-44-54
15. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е. Структурные особенности и гормональная регуляция зиготического эмбриогенеза злаков // Успехи современной биологии. 2019в. Т. 139. № 4. С. 326–337. DOI: 10.1134/S0042132419040057
16. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е., Никонов В.И. Выявление засухоустойчивых генотипов пшеницы в культуре незрелых зародышей *in vitro* // Вестник БГАУ. 2019г. Т. 52. № 4. С. 37–41.
17. Круглова Н.Н., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е. Зародыш цветковых растений в критическую стадию относительной автономности эмбриогенеза (на примере злаков) // Онтогенез. 2020. Т. 51. № 1. С. 3–18. DOI: 10.31857/S0475145020010024
18. Основы биотехнологии растений / Б.Р. Кулуев, Н.Н. Круглова, А.А. Зарипова, Р.Г. Фархутдинов. Уфа: РИЦ БашГУ, 2017. 244 с.

19. Сельдимирова О.А., Безрукова М.В., Галин И.Р., Лубянова А.Р., Шакирова Ф.М., Круглова Н.Н. Влияние 24-эпибрассинолида на формирование, ростовые показатели и регенерационную способность каллусов *in vitro* контрастных по засухоустойчивости сортов пшеницы // Физиология растений. 2017. Т. 64. № 6. С. 461-472. DOI: 10.1134/S1021443717060085
20. Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н., Никонов В.И. Оценка коллекции генотипов яровой мягкой пшеницы по отзывчивости эксплантов на условия культуры *in vitro* как биотехнологического приёма // Экобиотех. 2018. Т. 1. № 2. С. 71-79. DOI: 10.31163/2618-964X-2018-1-2-71-79
21. Kruglova N.N., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E. In Vitro Callus as a Model System for the Study of Plant stress-Resistance to Abiotic Factors (on the Example of Cereals) // Biol. Bull. Rev. 2018a. V. 8. P. 518-526. DOI: 10.1134/S2079086418060063
22. Kruglova N.N., Titova G.E., Seldimirova O.A. Callusogenesis as an in vitro Morphogenesis Pathway in Cereals // Russ. J. Dev. Biol. 2018b. V. 49. P. 245-259. DOI: 10.1134/S106236041805003X
23. Kruglova N.N., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E. Structural features and hormonal regulation of the zygotic embryogenesis in cereals // Biol. Bull. Rev. 2020a. V. 10. No 2. P. 115–126. DOI: 10.1134/S2079086420020048
24. Kruglova N.N., Titova G.E., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E., Veselov D.S. Embryo of Flowering Plants at the Critical Stage of Embryogenesis Relative Autonomy // Rus. J. Dev. Biol. 2020b. V. 51. No 1. P. 1–15. DOI: 10.1134/S1062360420010026
25. Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Kruglova N.N., Zaytsev D.Yu., Veselov S.Yu. Changes in distribution of zeatin and indolil-3-acetic acid in cells during callus induction and organogenesis *in vitro* in immature embryo culture of wheat // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 2016a. V. 52. P. 251–264. DOI: 10.1007/s11627-016-9767-4
26. Seldimirova O.A., Zaytsev D.Yu., Galin I.R., Kruglova N.N. Phytohormonal regulation of *in vitro* formation of wheat androgenic structures // Научный результат. Серия физиология. 2016b. Т. 2. № 1(7). С. 3–8.
27. Seldimirova O.A., Bezrukova M.V., Galin I.R., Lubyanova A.R., Shakirova F.M., Kruglova N.N. 24-Epibrassinolide Effect on *in vitro* Callus Tissue formation, Growth, and Regeneration in Wheat Varieties with Contrasting Drought Resistance // Russ. J. Plant Physiol. 2017**.** V. 64. P. 919–929. DOI: 10.1134/S1021443717060085
28. Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Katsuhara M., Galin I.R., Zaitsev D.Yu., Kruglova N.N., Veselov D.S., Veselov S.Yu. Dynamics of the contents and distribution of ABA, auxins and aquaporins in developing caryopses of an ABA-deficient barley mutant and its parental cultivar // Seed Sci. Res. 2019a. DOI: 10.1017/S0960258519000229
29. Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Kruglova N.N., Galin I.R., Veselov D.S. Somatic Embryogenesis in Wheat and Barley Callus in vitro Is Determined by the Level of Indolilacetic and abscisic Acids // Russ. J. Dev. Biol. 2019b. V. 50. P. 124–135. DOI: 10.1134/S1062360419030056
30. Shakirova F., Allagulova Ch., Maslennikova D., Fedorova K., Yuldashev R., Lubyanova A., Bezrukova M., Avalbaev A. Involvement of dehydrins in 24-epibrassinolide-induced protection of wheat plants against drought stress // Plant Physiol. Biochem. 2016. V. 108. P. 539–548. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.07.013