БИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ, ГЕНЕТИКА

УДК 581.143.6:571.175.12
DOI: 10.31040/2222-8349-2022-0-4-26-31

МОРФОГЕНЕЗ *IN VITRO* В КАЛЛУСАХ ЯЧМЕНЯ: ВЛИЯНИЕ НАФТИЛФТАЛАМОВОЙ КИСЛОТЫ

© О.А. Сельдимирова, И.Р. Галин

Методом световой микроскопии изучен морфогенез *in vitro* в каллусах ячменя сорта Steptoe и его АБК-дефицитного мутанта AZ34 под влиянием ингибитора полярного транспорта ауксинов – N-1-нафтилфталамовой кислоты (НФК). Выявлено формирование «полимерных» эмбриоидов (полиэмбриоидов), характеризующихся наличием множественных, часто сросшихся (фасциированных) в той или иной степени органов в каллусах Steptoe, и формирование фасциированных корней в каллусах AZ34. Методом иммунолокализации изучено распределение ИУК в каллусах обоих генотипов. Установлено, что наиболее интенсивное окрашивание на ИУК у обоих генотипов обнаруживалось в фасциированных корнях. Подтверждена важная роль полярного транспорта ауксинов в регуляции морфогенеза *in vitro* растений.

Ключевые слова: ячмень, каллус, ИУК, НФК, морфогенез *in vitro*, иммунолокализация.

Хорошо известно, что фитогормональный фактор является ключевым при разработке различных биотехнологий, ведущих к формированию полноценных растений-регенерантов, в том числе посредством различных путей морфогенеза в каллусных культурах *in vitro* [1–4].

Ключевым регулятором практически всех процессов роста и развития растений является ауксин, активирующий деление и растяжение клеток, определяющий развитие сосудов и формирование корней, обладающий аттрагирующим эффектом – способностью притягивать питательные вещества [5]. Известно несколько соединений, проявляющих ауксиновую активность. Это индол-3-уксусная кислота (ИУК) – универсальный ауксин всех растений, а также индол-3-бутировая и фенилуксусная кислоты, характеризующиеся очень слабой гормнальной активностью [5].

Для ИУК характерно ярко выраженное полярное передвижение по тканям растительного организма. Градиенты концентрации ИУК действуют как мощный морфогенетический фактор и обеспечивают формирование осей симметрии у высших растений на организменном уровне. Полярный транспорт ауксина регулирует практически все процессы морфогенеза [5, 6].

Роль полярного транспорта ауксина в морфогенетических процессах подтверждается многочисленными экспериментами с использованием ингибиторов полярного транспорта ауксинов, таких как 2,3,5-трийодбензойная кислота (ТИБК), N-1-нафтилфталамовая кислота (НФК) и кверцетин [7, 8]. Наиболее частыми морфологическими проявлениями воздействия этих веществ являются сросшиеся трубковидные семядоли, нарушения в развитии апикальных меристем побега и корня, формирование шаровидных соматических зародышей, неспособных к дальнейшему развитию, удвоение или мультипликация эмбриональных осей [4, 6–8].

Таким образом, не вызывает сомнения тот факт, что полярный транспорт ауксина – ключевой фактор, в конечном итоге регулирующий многие процессы роста и морфогенеза растений. Однако бóльшая часть исследований с применением ингибиторов полярного транспорта ауксинов выполнена на модельном двудольном растении – арабидопсисе или представителях хвойных. Работы с использованием злаков в литературе единичны. Данные о влиянии ингибиторов полярного транспорта ауксинов на содержание и распределение эндогенной ИУК у злаков также малочисленны [7, 8].

СЕЛЬДИМИРОВА Оксана Александровна – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,
e-mail: o_seldimirova@mail.ru
ГАЛИН Ильшат Рафкатович – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,
e-mail: ilshat.rafkatovitch@gmail.com

В связи с этим цель работы состояла в изучении воздействия ингибитора полярного транспорта ауксина нафтилфталамовой кислоты на морфогенез в каллусной культуре *in vitro* ячменя, а также распределение эндогенной ИУК в каллусах.

Материал и методы исследования. Объект исследования – ячмень сорта Steptoe и его АБК-дефицитный мутант AZ34. Для экспериментов использовали донорные растения, выращенные в полевых условиях научного стационара Уфимского Института биологии УФИЦ РАН (Уфимский район).

В качестве эксплантов для получения каллусов использовали незрелые зародыши на 13–15 сутки после массового цветения. Каллусы получали, как описано в [9]: базовая питательная среда (контроль) содержала макр-, микросоли и витамины по прописи Мурасиге-Скуга (МС), а также 100 мг/л мио-инозита, 30 г/л сахарозы, 100 мг/л гидролизата альбумина, 2 мг/л глицина, 10 г/л агара, 2.0 мг/л 2,4-Д, 0.5 мг/л 6-БАП и 12.5 мг/л $CuSO_4 \times 12H_2O$. Для изучения влияния на морфогенез *in vitro* ингибитора полярного транспорта ауксинов в базовую среду добавляли N-1-нафтилфталамовую кислоту (НФК) в концентрации 29 мг/л [10]. Каллусы культивировали в течение 4 недель в темноте, при 26ºС. Для индукции в каллусах морфогенетических процессов каллусы переносили на базовую среду без добавления регуляторов роста. Для гистологического анализа и иммунолокализации гормонов использовали каллусы через 2 недели культивирования *in vitro* на среде без регуляторов роста.

Содержание эндогенной ИУК определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа, как описано в [9]. Иммунолокализацию эндогенной ИУК проводили, как описано в [11].

Постоянные препараты готовили согласно общепринятой методике [12]. Препараты просматривали и документировали с использованием микроскопа проходящего света Axio Imager (Carl Zeiss, Jena, Германия), оснащенного цифровой камерой AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Jena, Германия).

Результаты и обсуждение. Гистологический анализ каллусов через 2 недели переноса их на базовую среду без регуляторов роста показал, что в каллусах ячменя сорта Steptoe индуцировался такой путь морфогенеза *in vitro*, как эмбриоидогенез (формирование зародышеподобных структур) (рис. 1, *а*). Ранее [9] нами было показано, что в каллусах, индуцированных на базовой среде, формируются эмбриоиды, имеющие типичное для зародышей злаков строение. Введение в базовую среду НФК приводило к формированию в каллусах ячменя сорта Steptoe «полимерных» эмбриоидов (полиэмбриоидов), характеризующихся наличием множественных, часто сросшихся (фасциированных) в той или иной степени органов – щитков, апексов побегов и корневых меристем/корней (рис. 1, *а*). У АБК-дефицитного ячменя AZ34 через 1 неделю переноса их на базовую среду без регуляторов роста ранее также было выявлено формирование эмбриоидов, отличающихся, однако, аномальным строением и задержкой развития [9]. Введение в базовую среду НФК полностью ингибировало формирование в каллусах AZ34 эмбриоидов и индуцировало такой путь морфогенеза *in vitro*, как ризогенез (формирование корней) (рис. 1, *б*). Гистологический анализ показал, что корни были в той или иной степени фасциированными, отдельные корни встречались очень редко и часто характеризовались наличием аномально увеличенных корневых меристем (рис. 1, *б*).

Формирование подобных полимерных зародышей и эмбриоидов у различных представителей цветковых растений может происходить спонтанно *in vivo* или быть индуцировано различными обработками *in situ*: синтетическими ауксинами, рентгеновским облучением, ингибиторами полярного транспорта ауксинов. При этом большинство авторов предполагают, что физиологический механизм формирования таких полимерных структур состоит в нарушении полярных потоков ауксинов в процессе становления их билатеральной симметрии при переходе зародышей/эмбриоидов от глобулярной стадии к органогенезу. Некоторые авторы трактуют этот механизм как нарушение апикального доминирования, существующего в зародыше уже на глобулярной стадии развития, другие рассматривают его как процесс нарушения связей между клетками раннего проэмбрио под действием регуляторов роста или ингибиторов полярного транспорта ауксина, индуцирующих экспрессию тотипотентности в каждой клетке проэмбрио (работа [13] и ссылки из нее).

Что касается структурного механизма формирования таких структур, то, по мнению неко-

торых авторов (работа [13] и ссылки из нее), случаи образования структур с множественными органами следует рассматривать как проявление кливажной полиэмбрионии, но незавершенной, связанной с вовлечением в этот процесс крупных кластеров клеток.

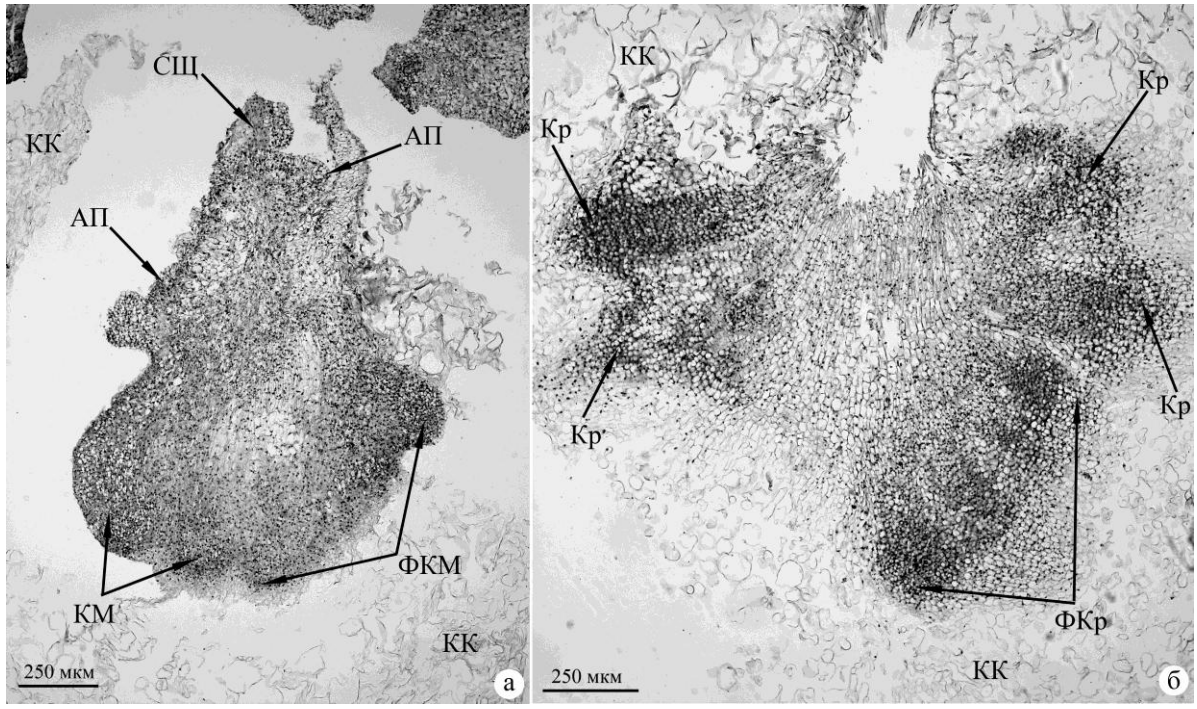

Рис. 1. Формирование полиэмбриоидов (*а*) и фасциированных корней (*б*) в калусах ячменя сорта Steptoe и его АБК-дефицитного мутанта AZ34 соответственно через 2 недели после переноса на базовую питательную среду без добавления регуляторов роста. Условные обозначения: АП – апекс побега, КК – клетки каллуса, КМ – корневая меристема, Кр – корень, СЩ – сросшиеся щитки, ФКМ – фасциированные корневые меристемы, ФКр – фасциированные корни

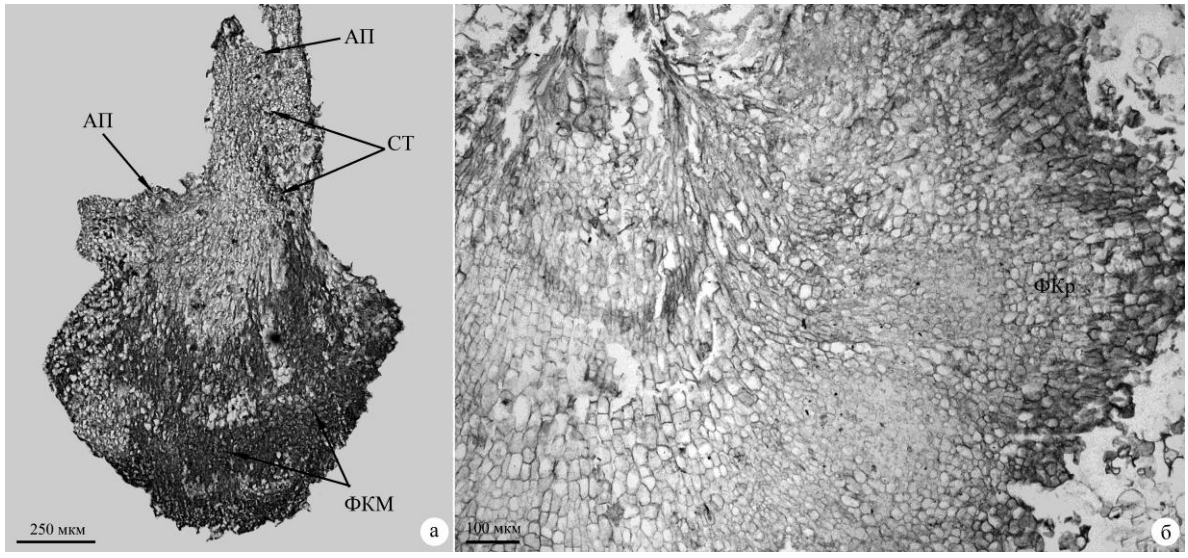

Рис. 2. Иммунолокализация ИУК в клетках полиэмбриоидов (*а*) и фасциированных корней (*б*), сформированных в каллусах ячменя сорта Steptoe и его АБК-дефицитного мутанта AZ34 соответственно через 2 недели после переноса на базовую питательную среду без добавления регуляторов роста. Условные обозначения: АП – апекс побега, СТ – сосудистый тяж, ФКМ – фасциированные корневые меристемы, ФКр – фасциированные корни

Специфика проявления кливажной полиэмбрионии состоит не только в вовлечении в образование множественных зародышей целых кластеров клеток и их неполном разделении, но и (особенно после глобулярной стадии развития) в различной топографии и срастании их органов, а также ряде других специфических особенностей развития, свидетельствующих о том, что кливажная полиэмбриония в этом случае сопровождается фасциациями – конгенитальным срастанием нескольких компонентов/нескольких меристем. Один из внешнеморфологических признаков срастания – наличие в фасциированном органе отдельных компонентов, сохраняющих до некоторой степени свою самостоятельность и стремящихся к обособлению (работа [13] и ссылки из нее).

Иммунолокализация ИУК в каллусах ячменя сорта Steptoe показала, что преимущественное окрашивание на этот ауксин отмечалась в корневых меристемах фасциированных корней полиэмбриоидах, а также в клетках сосудистых тяжей, соединяющих корни и множественные апикальные меристемы побегов полиэмбриоидов (рис. 2, *а*). В каллусах АБК-дефицитного мутанта AZ34 преимущественное окрашивание на ИУК наблюдалось в корневых меристемах фасциированных корней (рис. 2, *б*).

Меристематические ткани апексов побегов считаются основным местом синтеза ауксинов [14]. Однако нами не выявлено интенсивное окрашивание клеток апексов побегов полиэмбриоидов (рис. 2, *а*), что согласуется с полученными нами ранее [11] данными о распределении ИУК в органах, формирующихся в каллусах пшеницы: наиболее сильное окрашивание на ИУК было выявлено в клетках закладывающихся меристем апексов побегов, в дальнейшем же апексы побегов окрашивались на ауксины слабо.

В то же время повышенное накопление ИУК в клетках, участвующих в формировании корней как у полиэмбриоидов (рис. 2, *а*) в каллусах Steptoe, так и при ризогенезе в каллусах AZ34 (рис. 2, *б*), может быть связано со способностью корней синтезировать ауксины [15], а также с тем, что в корнях обнаружена экспрессия нескольких генов *YUCCA*, контролирующих синтез ауксинов [16]. Кроме того, в каллусах AZ34 это может объясняться повышенным содержанием ИУК (которая, как известно, индуцирует формирование корней [5]) на фоне пониженного содержания АБК.

Нельзя оставить без внимания и модель синтеза и полярного транспорта ауксинов в зародыше однодольных растений в процессе становления билатеральной симметрии, разработанную [7]. Согласно этой модели, в глобулярном зародыше имеет место диффузия или многонаправленный активный транспорт ауксина в направлении протодермы. При переходе к органогенезу устанавливается его направленный полярный транспорт от внутренних слоев зародыша к наружным (протодерме), в специфические участки, для инициации клеточных делений в этих участках и роста щитков. Авторы предположили существование вокруг апикальной части недифференцированного зародыша злаков кольца клеток, морфогенетически компетентных к инициации меристемы побега. Для реализации этой компетенции таким клеткам необходим импульс в виде потока ауксина. В обычно развивающихся зародышах полярный транспорт ауксина к одной группе клеток инициирует промеристему побега. Как следствие, ауксин недоступен/недостаточен другим группам клеток для приобретения ими меристематического статуса. Под действием ингибитора происходит нарушение полярного транспорта ауксинов и их накопление в местах синтеза (например, в корнях, рис. 2). Ауксины могут диффундировать или транспортироваться через новые потоки к другим группам клеток кольцевидной меристематической зоны (например, в полиэмбриоидах, рис. 2, *а*). Это приводит к образованию в ней множественных очагов, на основе которых возникают новые меристемы побегов. Отсутствие ауксина в зоне инициации меристемы побега на этой стадии, согласно авторам, обусловлено отсутствием полярного транспорта этого гормона к ее клеткам.

Согласно более поздней, уточненной модели синтеза и полярного транспорта ауксина, разработанной [8] и основанной на анализе локализации свободной эндогенной ИУК и переносчика ауксина – ZmPIN1, в клетках зародыша кукурузы на этих же стадиях развития, в зародыше злаков на глобулярной стадии развития уже осуществляется активный полярный поток ауксина в направлении от основания к верхушке собственно зародыша (к протодерме). Переход от радиальной симметрии к билатеральной связан с инверсией поляризации белка-переносчика PIN1 на мембранах клеток собственно зародыша

и протодермы, и соответственно, транспорта ауксина, осуществляемого этим переносчиком.

С этой моделью согласуются результаты, полученные в работе [13]: развитие полиэмбриоидов пшеницы характеризуется необычным характером делений их клеток, начиная с ранне-глобулярной стадии развития, состоящим в формировании рядов периклинально делящихся клеток, радиально расходящихся от зоны инициалей чехлика первичного корня и колеоризы в направлении периферии полиэмбриоида. Это приводит к расширению апикальной части полиэмбриоида с сохранением ее радиальной симметрии. В протодерме также наблюдаются непрерывные периклинальные деления. При переходе к органогенезу меристематическая активность верхней части полиэмбриоида постепенно затухает, и клеточные деления концентрируются в периферической части апекса, по кольцу. При этом отмечается прекращение периклинальных делений клеток поверхностного слоя полиэмбриоида, что приводит к окончательному отделению слоя протодермы. Эти изменения могут свидетельствовать о смене вектора делений клеток в их поверхностном слое (периклинальных на только антиклинальные) при переходе от глобулярной стадии к заложению органов и объяснять структурный механизм, лежащий в основе модели инверсии полярного транспорта ауксина в зародыше при переходе к органогенезу, предложенный в [15].

Таким образом, не вызывает сомнения тот факт, что полярный транспорт ауксина – ключевой фактор в конечном итоге регулирующий все процессы роста и морфогенеза растений. Однако следует отметить, что молекулярные механизмы, посредством которых ауксин действует как морфоген в определенных участках зародыша/эмбриоида, до сих пор слабо изучены и нуждаются в дальнейшем исследовании.

В работе использована приборная база ЦКП «Агидель» УФИЦ РАН.

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

Литература

1. Su Y.H., Zhang X.S. The Hormonal Control of Regeneration in Plants // Current Topics in Developmental Biology. V. 8. Mechanisms of Regeneration / Ed. Galliot B. 2014. P. 35–69.

2. Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications / Eds Loyola-Vargas V., Ochoa-Alejo N. Springer, Cham, 2016. 506 p.

3. Pérez-Pérez Y., Ahmed-Abdalla El-Tantawy A.-A., Solís M.T., Risueño M.C., Pilar S. Testillano P.S. Stress-Induced Microspore Embryogenesis Requires Endogenous Auxin Synthesis and Polar Transport in Barley // Front Plant Sci. 2019. V. 10: 1200. DOI: 10.3389/fpls.2019.01200

4. Tang L.P., Zhang X.S., Su U.H. Regulation of cell reprogramming by auxin during somatic embryogenesis // aBIOTECH. 2020. V. 1. № 3. P. 185–193.

5. Медведев С.С., Шарова Е.И. Биология развития растений. Т. 1. Начала биологии развития растений. Фитогормоны. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2011. 256 с.

6. Polar Auxin Transport / Eds Chen R., Baluška F. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013. 343 p.

7. Fischer-Iglesias C., Sundberg B., Neuhaus G., Jones A.M. Auxin distribution and transport during embryonic pattern formation in wheat // Plant J. 2001. V. 26. № 2. P. 115–129.

8. Forestan C., Meda S., Varotto S. ZmPIN1-mediated auxin transport is related to cellular differentiation during maize embryogenesis and endosperm development // Plant Physiol. 2010. V. 152. № 3. P. 1373–1390.

9. Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Kruglova N.N., Galin I.R., Veselov D.S. Somatic Embryogenesis in Wheat and Barley Calli *in vitro* Is Determined by the Level of Indoleacetic and Abscisic Acids // Russ. J. Dev. Biol. 2019. V. 50. № 3. P. 124–135.

10. Сельдимирова О.А., Кудоярова Г.Р., Галин И.Р., Веселов Д.С., Круглова Н.Н. Влияние ингибиторов синтеза АБК и транспорта ауксинов на морфоргенез в культуре *in vitro* и активность пероксидаз у дефицитного по АБК мутанта ячменя и его исходного генотипа // Биомика. 2019. Т.11. № 4. С. 386–393.

11. Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Kruglova N.N., Zaytsev D.Yu., Veselov S.Yu. Changes in distribution of zeatin and indole-3-acetic acid in cells during callus induction and organogenesis *in vitro* in immature embryo culture of wheat // *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 2016. V. 52. № 3. P. 251–264.

12. Круглова Н.Н., Егорова О.В., Сельдимирова О.А., Зайцев Д.Ю., Зинатуллина А.Е. Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений. Уфа: Гилем, Башк. энцикл., 2013. 128 с.

13. Titova G.E., Seldimirova O.A., Kruglova N.N., Galin I.R., Batygina T.B. Phenomenon of «Siamese Embryos» in Cereals *in vivo* and *in vitro*: Cleavage Polyembryony and Fasciations // Russian Journal of Developmental Biology. 2016. V. 47. № 3. P. 122–137.

14. Leyser O. The control of shoot branching: an example of plant information processing // Plant Cell Environ. 2009. V. 32. № 6. P. 694–703.

15. Ljung K., Hull A.K., Celenza J., Yamada M., Estelle M., Normanly J., Sandberg G. Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots // Plant Cell. 2005. V. 17. № 4. P. 1090–1104.

16. Chen Q., Dai X., De-Paoli H., Cheng Y., Takebayashi Y., Kasahara H., Kamiya Y., Zhao Y. Auxin overproduction in shoots cannot rescue auxin deficiencies in *Arabidopsis* roots // Plant Cell Physiol. 2014. V. 55. № 6. P. 1072–1079.

MORPHOGENESIS *IN VITRO* IN BARLEY CALLUS: INFLUENCE OF NAPHTYLPHTHALAMIC ACID

© O.A. Seldimirova, I.R. Galin

Ufa Institute of biology – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Sciences,
69, prospect Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

Morphogenesis *in vitro* in barley calli of the cv. Steptoe and its ABA-deficient mutant AZ34 under the influence of an inhibitor of polar auxin transport, N-1-naphthylphthalamic acid (NPA), was studied by light microscopy The formation of «polymeric» embryoids (polyembryoids), characterized by the presence of multiple, often fused (fasciated) organs in varying degrees, in calli of cv. Steptoe and the formation of fasciated roots in calli of AZ34 were revealed. The distribution of IAA in calli was studied by the immunolocalization method. It was found that the most intense staining for IAA in both genotypes was found in fasciated roots. The important role of the polar transport of auxins in the regulation of plant morphogenesis *in vitro* has been confirmed.

Keywords: barley, callus, IAA, NPA, morphogenesis *in vitro*, immunolocalization.