

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ ДЛЯ ЭМБРИОГЕННОЙ КУЛЬТУРЫ *Larix sibirica in vitro*

© 2020 г. И. Н. Третьякова*, *****, @, Е. А. Рогожин**, ***, ****, М. Э. Пак*,
И. А. Петухова*****, А. С. Шуклина*, А. П. Пахомова*, В. С. Садыкова***

*Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН,
Академгородок, 50, стр. 28, Красноярск, 660036 Россия

**Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, 117997 Россия

***Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе,
ул. Большая Пироговская, 11, стр. 1, Москва, 119021 Россия

****Тюменский государственный университет, ул. Володарского, 6, Тюмень, 625003 Россия

*****Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
“Сибирский федеральный университет”, просп. Свободный, 79, Красноярск, 660041 Россия

@E-mail: culture@ksc.krasn.ru

Поступила в редакцию 21.08.2018 г.

После доработки 19.11.2018 г.

Принята к публикации 19.11.2018 г.

Испытано влияние антимикробных растительных пептидов на инициацию каллуса и эмбрионально-суспензорной массы, образование соматических зародышей и прорастание регенерантов лиственницы сибирской. В качестве объектов растительного происхождения использованы белково-пептидные экстракты семян ширицы запрокинутой, семян чернушки посевной и колосьев пырея удлиненного. Пептиды введены в питательную среду на стадии инициации эмбрионных культур и прорастания соматических зародышей. Выявлена стимуляция образования эмбрионных культур лиственницы сибирской под действием пептидов. Различий в росте контрольных и опытных регенерантов не отмечено. Предполагается, что проведенные исследования могут повысить иммунитет клонированных саженцев лиственницы сибирской.

DOI: 10.31857/S0002332920030091

В последние 30 лет наиболее перспективное направление в микроклональном размножении хвойных – соматический эмбриогенез в культуре *in vitro*. С помощью данного метода можно не только осуществлять массовое тиражирование хвойных видов с селекционно-значимыми признаками, но и проводить фундаментальные исследования в области биологии развития – изучение морфогенетических программ в раннем онтогенезе (Lelu *et al.*, 1994; Lelu-Walter *et al.*, 2008; Klimaszewska *et al.*, 2000, 2008; Cairney, Pullman, 2007; Lelu-Walter, Pâques, 2009; Pullman, Biscalo, 2011; Третьякова, Барсукова, 2012, 2015; Третьякова, 2013; Третьякова и др., 2016).

С помощью соматического эмбриогенеза можно сохранять генетические ресурсы в течение длительного времени благодаря криоконсервации и способности эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ) длительно пролиферировать, сохраняя эмбрионный потенциал. Так, в культуре мегагаметофитов *Larix decidua* и культуре зародышей гибридов лиственницы (*Larix × eurolepis* и

Larix × marschlinsii) образование соматических зародышей происходило в течение 9 лет (von Aderkas, Anderson, 1993; von Aderkas *et al.*, 2003; Lelu-Walter, Pâques, 2009). В полученных нами клеточных линиях (Кл) *L. sibirica* эмбрионная продуктивность сохранялась 9 лет и более (Третьякова, Пак, 2018). Такие Кл продуцировали от 2000 до 11 000 глобулярных зародышей на 1000 мг ЭСМ. Однако не все зародыши созревали, а часть зрелых зародышей и регенерантов имели морфологические нарушения в доменах, особенно базальном (Пак и др., 2016). Аномальные по фенотипу регенеранты не всегда были жизнеспособны (Третьякова и др., 2016).

Для повышения своего врожденного иммунитета к комплексу стрессовых факторов окружающей среды (биотической и абиотической природы) растения часто используются защитные пептиды. Большинство из них – антимикробные пептиды (АМП), которые синтезируются конститутивно и индуцированно для борьбы с патогенами и явля-

ются 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 *Echinochloa crusgalli*, пшеница *Triticum kiharae*, чернушка посевная *Nigella sativa*, звездчатка средняя *Stellaria media* (Odintsova *et al.*, 2008, 2009; Ощепкова и др., 2009; Рогожин и др., 2009; Rogozhin *et al.*, 2011; Slavokhotova *et al.*, 2011, 2014; и др.). Эти АМП подавляют рост и развитие патогенных грибов и бактерий и в целом повышают устойчивость растений к другим стрессовым факторам среды. Влияние растительных АМП на хвойные растения до сих пор не исследовалось. Поэтому изучение запуска механизмов, индуцирующих устойчивость, а также исследование морфогенеза и ростовой активности растений, обработанных пептидами, — перспективное направление для хвойных, введенных в культуру *in vitro*, где можно ожидать повышения выхода устойчивых к патогенам регенерантов и соматических сеянцев. Для усиления иммунитета хвойных растений, введенных в культуру *in vitro*, и возможного повышения улучшения ростовых процессов, а также выхода регенерантов было проведено экспериментальное воздействие АМП, выделенных из семян ряда дикорастущих растений, обладающих более высоким биоэкологическим потенциалом по сравнению с культурными формами, а следовательно, и большей степенью устойчивости.

Цель работы — выращивание эмбрионных культур лиственницы сибирской на питательной среде с различными концентрациями защитных пептидов растительного происхождения *in vitro* для достижения прямого антимикробного эффекта, а также запуска механизмов индуцированной устойчивости (регуляторной функции эмбрионных культур), изучение морфогенеза и ростовой активности соматических зародышей и проростков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве эксплантов были взяты незрелые семена лиственницы сибирской дерева № А4, произрастающего в дендрарии Института леса (Красноярск) (Пак и др., 2016; Третьякова и др., 2016).

Инициацию эмбрионных культур проводили из незрелых зиготических зародышей данного дерева лиственницы на среде АИ (Третьякова, 2012), (патент РФ № 2456344 <http://www.freepatent.ru/images/patents/5/2456344/patent-2456344.pdf>, зарегистрирован в Государственном реестре изобретений РФ 22. 07. 2012). В среду АИ добавляли регуляторы

роста 2,4-дихлорфеноксисукусную кислоту (2,4-Д) (2 мг/л) и 6-бензиламинопурин (БАП) (0.5 и 1 мг/л соответственно). Для поддержания пролиферирующих эмбрионных культур через каждые две недели проводили субкультивирование.

Созревание соматических зародышей лиственницы сибирской выполняли на базовой питательной среде АИ, содержащей сахарозу (40 г/л), абсцизовую кислоту (АБК) (32 мг/л), индолилмасляную кислоту (ИМК) (0.2 мг/л) и полиэтиленгликоль (ПЭГ 8000) (10%). В качестве желирующего агента использовали Gelrite (4 г/л). Культивирование осуществляли в темноте при $24 \pm 1^\circ\text{C}$. В охлажденную питательную среду после автоклавирования добавляли регуляторы роста (АБК и ИМК), а также L-глутамин (500 мг/л) и аскорбиновую кислоту (400 мг/л) методом холодной стерилизации с использованием бактериальных фильтров (ТРР, Швейцария). Созревшие зародыши переносили на базовую среду 1/2АИ для прорастания, свободную от растительных регуляторов роста.

В качестве объектов растительного происхождения были использованы белково-пептидные экстракты (БПЭ) следующих видов растений: семена щирицы запрокинутой *Amarantus retroflexus*, собранной в 2003 г. в г. Пушкино (Московская обл.); семена черного тмина, или чернушки посевной *Nigella sativa*, выращенные в 2008 г. и предоставленные сотрудниками Института биологической химии РАН, и колосья пырея удлиненного *Elytrigia elongata*, собранные в 2010 г. на побережье (г. Севастополь). Биологический материал хранился в сухом проветриваемом помещении при $16\text{--}18^\circ\text{C}$.

БПЭ получали по ранее разработанной и апробированной схеме (Egorov *et al.*, 2005). Она основана на комбинировании экстракции тотальной белково-пептидной составляющей буфером на базе водной органической кислоты (или смеси органической и неорганических кислот) с последующим фракционированием трехстадийной с жидкостной хроматографией среднего и высокого давления с предварительной твердофазной экстракцией (ТФЭ). Экстракцию измельченного растительного материала осуществляли 10-кратным количеством (w/v) экстрагирующего буфера, содержащего 1 М соляную кислоту, 1%-ную муравьиную кислоту, 1%-ную трифторуксусную (ТФУ) кислоту и 1%-ный хлорид натрия, взмучивали и интенсивно перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. После завершения данного этапа экстракции и центрифугирования (6000 об./мин, 10 мин, 4°C) надосадочную жидкость фильтровали через бумажный фильтр и концентрировали с помощью ротационного упаривателя примерно вдвое. Полученный упаренный экстракт по каждому растению разделяли на две равные части. Первую часть использовали для высаживания охлажденным 2-

пропанолом (Химмед, ОСЧ) в соотношении 1 : 10 (объем/объем) при добавлении 50 мкл ледяной уксусной кислоты в течение 14 ч при 4°C, а вторую дробно высушивали досуха с помощью вакуумного центрифугиконцентратора. Осадок, образовавшийся после высаживания 2-пропанолом, собирали центрифугированием (5000 об./мин, 5 мин, 4°C) и высушивали на воздухе при комнатной температуре и интенсивном механическом измельчении. После этого осадки по обеим частям независимо перерастворяли в 0.1%-ном растворе ТФУ и обессоливали от низкомолекулярных гидрофильных алифатических метаболитов, разнообразных ароматических соединений, органических кислот методом ТФЭ на гидрофобном сорбенте, представляющем собой силикагельную основу с ковалентно-присоединенной алкильной фазой длиной C₈ углеродных атомов. Данный метод грубого фракционирования позволяет проводить концентрирование белков (в среднем диапазоне молекулярных масс) и пептидов при довольно существенном отделении многочисленных примесей, имеющих небелковую природу. Элюирование суммарной фракции, связанной с неподвижной фазой колонки, по каждому варианту элюировали 60%-ным водным раствором ацетонитрила с добавлением 0.1%-ной ТФУ, после чего упаривали избыток растворителя и лиофилизировали в целях полного удаления свободной жидкости и остаточных количеств ТФУ.

Первичную структурную характеристику компонентов БПЭ проводили с использованием масс-спектрометрического анализа. Молекулярные массы целевого БПЭ измеряли на МАЛДИ-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex (Bruker Daltonics, Германия), оснащенном УФ-лазером (337 нм), в режиме положительных ионов. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту. На мишени смешивали равные объемы (по 0.7 мкл) образцов и матрицы (15 мг матрицы/мл в 80%-ном CH₃CN, 0.1%-ная ТФУ в воде MQ), и полученную смесь высушивали на воздухе. Масс-спектры анализировали с помощью программы Bruker DataAnalysis for TOF. Точность измерения составляла 0.015%.

Обработка пептидами растительного происхождения каллусных культур лиственницы сибирской in vitro на стадии инициации. В среду АИ вводили пептиды растительного происхождения, полученные из семян ширицы, чернушки и колосьев пырея (50, 100, 200, 400, 800, 1600 мкг/л). На данную среду помещали незрелые зародыши, полученные культуры выдерживались 1 мес., затем образовавшиеся каллусы и ЭСМ переносили на пролиферационную среду, где измеряли растущие каллусы и при необходимости вычленили ЭСМ. Для проведения гистологического анализа готовили давленные препараты по стандартной методике (Круг-

лова и др., 2013). Каллус помещали на предметное стекло, взвешивали, окрашивали сафранином в течение 3–5 мин, добавляли каплю глицерина, накрывали предметным стеклом, после чего слегка придавливали. Препараты просматривали на микроскопе МИКРОМЕД-6 ЛОМО (Санкт-Петербург) при увеличениях 10 × 4, 10 × 10 и 10 × 40. Замеры клеток и эмбриональных структур проводили с помощью системы ScopePhoto 3.0 (ScopeTek), с последующим переводом полученных единиц в микрометры.

Обработка пептидами растительного происхождения регенерантов лиственницы сибирской in vitro. Регенеранты лиственницы сибирской, полученные из длительно пролиферирующих клеточных культур Кл4 (8 лет пролиферации), помещали на безгормональную среду АИ, в которую вводили пептидные экстракты, полученные из семян ширицы, чернушки и колосьев пырея в концентрациях 25, 50, 100, 200, 400 и 800 мкг/л. На 28-е сутки прорастания измеряли длину проростков и число регенерантов, сформировавших корень. Статистическую обработку данных проводили по стандартным методикам (Лакин, 1973) с помощью программы Microsoft Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культивирование эксплантов лиственницы сибирской на среде АИ, дополненной белково-растительными экстрактами для получения эмбриогенных культур. При вводе экспланта лиственницы сибирской в культуру *in vitro* с белково-пептидными компонентами ширицы, чернушки и пырея (стадия инициации) уже через 1 мес. культивирования наблюдались различия в росте культур. При перенесении каллусов на среду пролиферации через 6 нед культивирования можно было вычленить эмбриогенные культуры, представляющие собой ЭСМ. Белая и рыхлая ЭСМ была отмечена во всех опытных вариантах (рис. 1, 2). Цитологические данные показали, что в варианте с использованием экстракта ширицы было получено 8 Кл ЭСМ (табл. 1), 6 Кл были образованы на среде АИ, дополненной пептидами (50 мкг/л), 1 Кл при концентрации пептидов 200 мкг/л и 1 Кл при концентрации пептидов 400 мкг/л (табл. 1). Кроме того, начальная стадия образования ЭСМ (образование эмбриональных трубок) была отмечена у 25 Кл всех опытных вариантов экстракта ширицы (табл. 1). При обработке экстрактом чернушки было получено только 2 Кл при концентрациях 100 и 200 мкг/л. Наибольшее число Кл (10) в опытных вариантах было получено у пырея. При этом ЭСМ образовывалась во всех культурах, обработанных разными концентрациями экстракта пырея. Начальная стадия инициации эмбриогенных культур также была отмечена на всех средах, обработанных пептидами (всего 22 Кл).

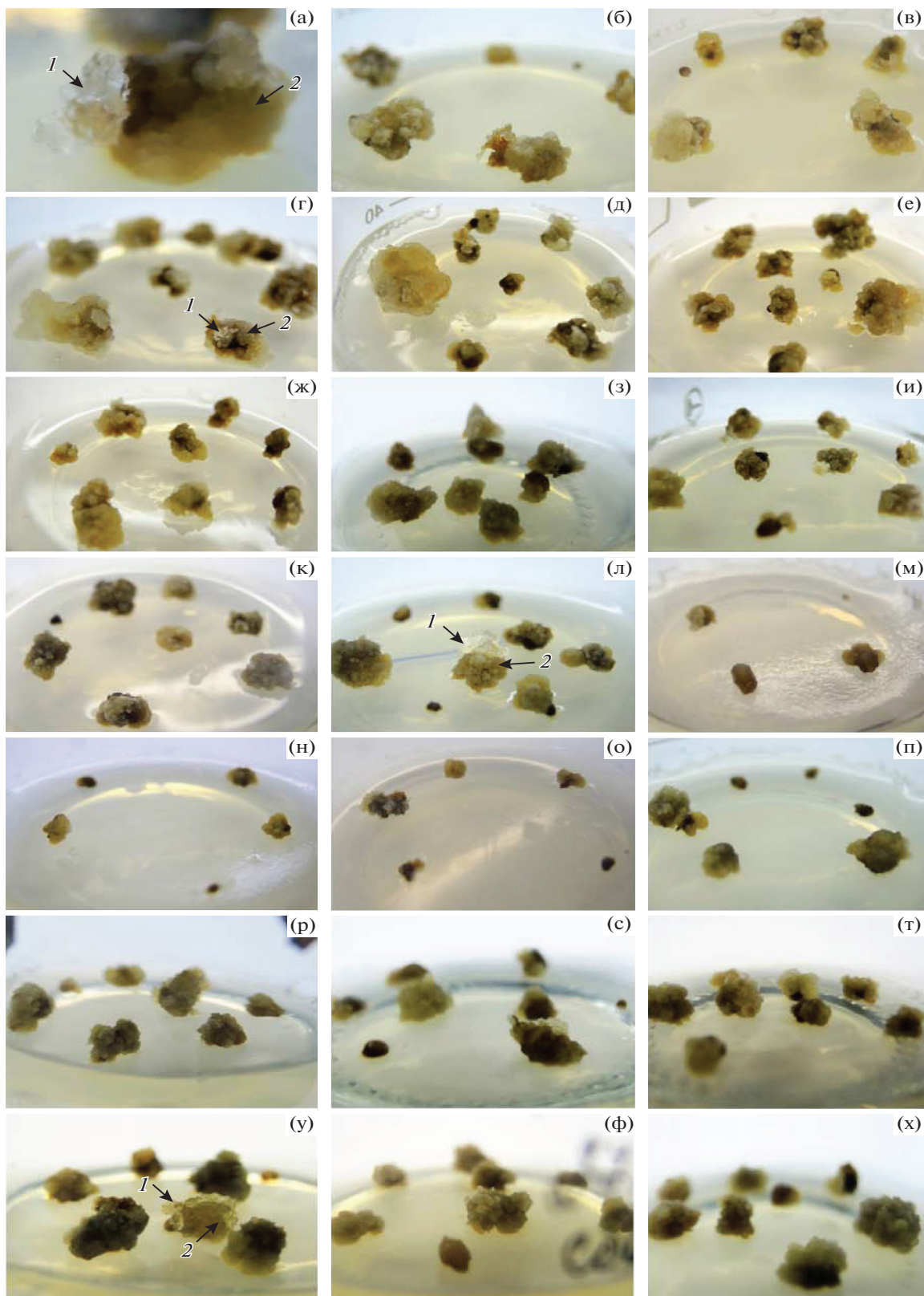


Рис. 1. Каллусообразование и соматический эмбриогенез *Larix sibirica* на средах, дополненных пептидами растительного происхождения. а–в – среда (контроль); г–и – среда, дополненная пептидами щирицы запрокинутой: г – 50, д – 100, е – 200, ж – 400, з – 800, и – 1600 мкг/л; к–п – среда, дополненная пептидами чернушки посевной: к – 50, л – 100, м – 200, н – 400, о – 800, п – 1600 мкг/л; р–х – среда, дополненная пептидами пырея удлиненного: р – 50 с – 100, т – 200, у – 400, ф – 800, х – 1600 мкг/л. Стрелками отмечены: 1 – эмбрионально-сuspензорная масса, 2 – каллус.

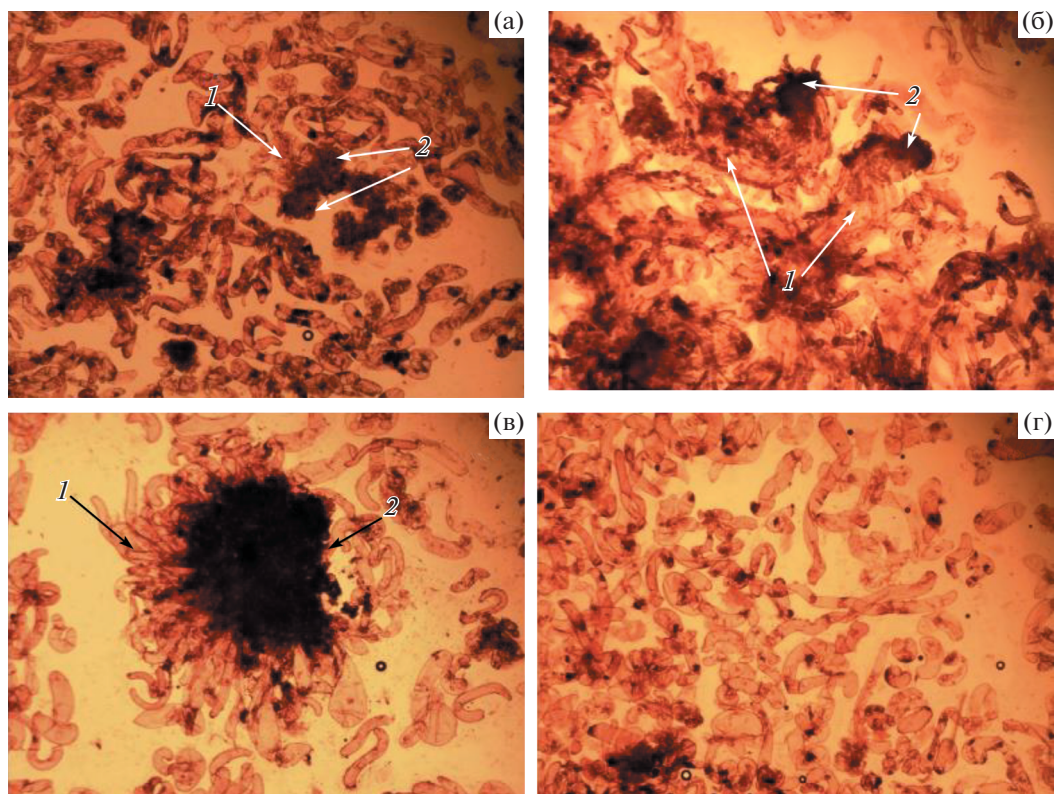


Рис. 2. Эмбрионально-суспензорная масса лиственницы сибирской, полученная в результате обработки эксплантов пептидами растительного происхождения. а – ширица запрокинутая, 50 мкг/л; б – чернушка посевная, 200 мкг/л; в – пырей удлинненный, 50 мкг/л; г – пырей удлинненный, 1600 мкг/л. Стрелками отмечены: 1 – суспензор, 2 – глобула зародыша.

Объем каллусов в контрольных и опытных вариантах варьировал. Наиболее интенсивный рост каллуса был отмечен в варианте обработки экстрактом ширицы в концентрации 100 мкг/л. Менее интенсивное нарастание каллуса наблюдалось в вариантах обработки экстрактами ширицы в высокой концентрации. У чернушки более активный рост каллуса был отмечен при низких концентрациях пептидов по сравнению с высокими концентрациями. У пырея наибольший объем каллуса наблюдался при концентрации пептидов 400 мкг/л. В вариантах обработки пептидами и контроле достоверных различий в росте каллусов не было.

Таким образом, в вариантах обработки пептидами в 2017 г. было получено 18 Кл, активно формирующих ЭСМ, и 52 Кл, у которых была выявлена начальная стадия образования ЭСМ (образование эмбриональных трубок). В контрольном варианте (среда АИ без пептидов) было обнаружено 5 Кл с ЭСМ и 10 Кл с начальной стадией образования эмбриогенных культур. В дальнейшем полученные клеточные линии будут подвергаться регулярным пересадкам на среду АИ для пролиферации, а затем будут переводиться на среду для созревания соматических зародышей, которые далее будут пе-

ренесены на среду для прорастания и получения регенерантов лиственницы сибирской.

Обработка прорастающих регенерантов белково-пептидными экстрактами растительного происхождения разных концентраций. Исследования проводились на прорастающих регенерантах, полученных из длительно пролиферирующей Кл 4 (8 лет пролиферации). Для экспериментов были использованы экстракты, полученные из семян ширицы, чернушки, а также из колосьев пырея. Для каждого биопрепарата были изучены концентрации 25, 50, 100, 200, 400 и 800 мкг/л. Обработка биопрепаратов в большинстве опытных вариантов не оказала значительного влияния на динамику роста в длину регенерантов *L. sibirica*. Лишь на 21-е сутки культивирования измерения проростков на среде для прорастания, содержащей биопрепарат из семян ширицы (100 мкг/л), показали достоверно более высокие значения длины, однако к 28-м суткам общие длины проростков во всех вариантах достоверно не различались (рис. 3, табл. 2). Повышение концентрации биопрепаратов до 200–800 мкг/л в большинстве случаев вызывало ингибирование роста соматических проростков. Исключение составил лишь вариант экстракта ширицы (800 мкг/л), у которо-

Таблица 1. Число клеточных линий с эмбрионально-суспензорной массой, обработанных белково-пептидными экстрактами растений на стадии инициации (2 мес. пролиферации)

Источник пептидов	Концентрация, мкг/л	Число клеточных линий с удлинёнными эмбриональными трубками*	Число эмбриогенных клеточных линий
Контроль	—	10	5
Щирица запрокинутая	50	10	6
	100	2	0
	200	2	1
	400	1	1
	800	3	0
	1600	7	0
Чернушка посевная	50	0	0
	100	2	1
	200	0	1
	400	2	0
	800	0	0
	1600	2	0
Пырей удлинённый	50	4	3
	100	3	1
	200	3	2
	400	5	1
	800	2	1
	1600	4	2

* Начальная стадия перехода соматических клеток на путь эмбриогенеза.

го средняя длина проростков не отличалась от контроля.

Ранее было отмечено, что при прорастании регенерантов не все проростки листовницы сибирской развиваются нормально. Наблюдалось растения с нарушениями развития доменов зародыша: гипокотыля, корня и семядолей (Пак и др., 2016; Третьякова и др., 2016). В проведенных нами экспериментах у контрольного варианта растения без отклонения составили только 22% общего числа. При обработке пептидами в большинстве вариантов наблюдалось повышение каллусообразования и снижение формирования нормальных проростков по сравнению с контролем. Доля формирования нормальных проростков, обработанных био пептидами, превышающая контрольную, была отмечена только у 10 вариантов из 18 (табл. 3).

Было обнаружено, что как контрольные регенеранты, так и обработанные БПЭ имеют наплывы в области корня, гипокотыля и на границе корня и гипокотыля (рис. 4). На 28-е сутки культивирования на питательной среде для прорастания наилучший результат был получен у варианта обработки био препаратом ширицы запрокинутой (800 мкг/л), пырея удлинённого (200 и 800 мкг/л),

где наблюдалось максимальное число регенерантов, сформировавших корень (соответственно 85, 80 и 80%), а также максимальное число нормально сформированных регенерантов (65, 45 и 35% соответственно) (табл. 3). Вариант обработки био препаратом чернушки посевной в концентрации 50 мкг/л оказал ингибирующее действие на развитие проростков *L. sibirica*, где показатели корнеобразования и формирования нормальных регенерантов были ниже, чем в контрольном варианте.

Выявлено, что на контрольных регенерантах и регенерантах, обработанных белково-пептидными экстрактами, развивался каллус в области корня. Таким образом, при добавлении антимикробных пептидов растительного происхождения в клеточные культуры *L. sibirica* большинство опытных вариантов не отличалось от контроля. АМП растительного происхождения не оказали стимулирующего эффекта. Прорастание соматических зародышей в опытах с АМП шло так же, как в контрольном варианте. Однако в вариантах с ширицей запрокинутой (800 мкг/л), пыреем удлинённым (200 и 800 мкг/л) была отмечена стимуляция корнеобразования. Ряд регенерантов, обработанных пептидами, формировали длинные

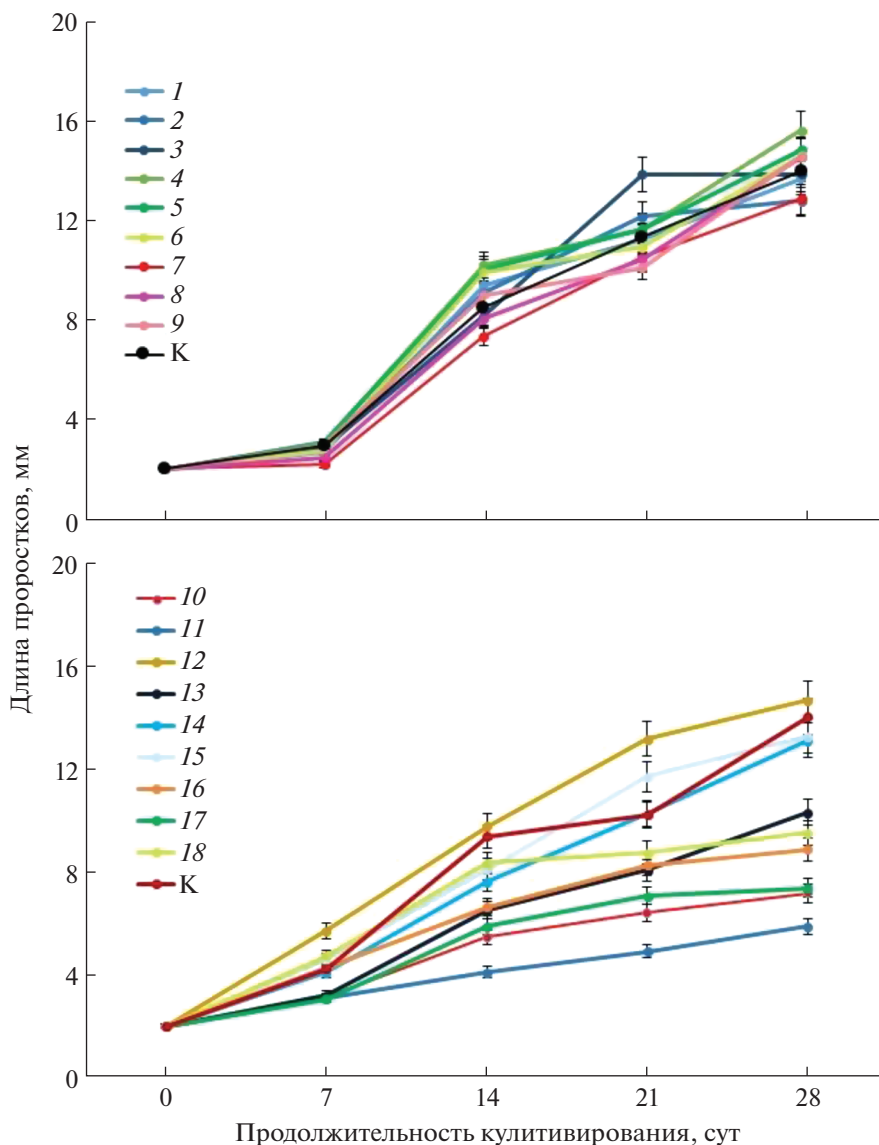


Рис. 3. Динамика роста регенерантов *Larix sibirica*, обработанных биопептидами растительного происхождения. а – низкие концентрации (25–100 мкг/л); б – высокие концентрации (200–800 мкг/л). 1 – щирца запрокинутая, 25 мкг/л; 2 – щирца запрокинутая, 50 мкг/л; 3 – щирца запрокинутая, 100 мкг/л; 4 – чернушка посевная, 25 мкг/л; 5 – чернушка посевная, 50 мкг/л; 6 – чернушка посевная, 100 мкг/л; 7 – пырей удлиненный, 25 мкг/л; 8 – пырей удлиненный, 50 мкг/л; 9 – пырей удлиненный, 100 мкг/л; 10 – щирца запрокинутая, 200 мкг/л; 11 – щирца запрокинутая, 400 мкг/л; 12 – щирца запрокинутая, 800 мкг/л; 13 – чернушка посевная, 200 мкг/л; 14 – чернушка посевная, 400 мкг/л; 15 – чернушка посевная, 800 мкг/л; 16 – пырей удлиненный, 200 мкг/л; 17 – пырей удлиненный, 400 мкг/л; 18 – пырей удлиненный, 800 мкг/л; К – контроль, базовая среда.

прямые корни. Такие соматические сеянцы были способны укореняться.

*Первичная структурная характеристика белково-пептидных компонентов активных экстрактов семян щирцы *A. retroflexus* и пырея *E. elongata*.* Ранее был исследован состав АМП семян щирцы, в которых был идентифицирован преобладающий в количественном отношении пептид Arg-AMP, принадлежащий к подсемейству 6-цистеиновых геветиноподобных антимикробных пептидов с хитинсвязывающим доменом (Lipkin *et al.*, 2005). Данный

пептид, обладающий выраженными антимикробными свойствами по отношению к ряду грибных фитопатогенов *in vitro*, – гомолог идентифицированного на начальных этапах исследования растительных АМП молекуле Ac-AMP2 из близкородственного вида *Amaranthus caudatus*, структура и функциональная активность которого были детально изучены ранее (Broekaert *et al.*, 1992; de Bolle *et al.*, 1993; Martins *et al.*, 1996). Кроме того, семена вида *A. caudatus* богаты источником других защитных пептидов, обладающих помимо анти-

Таблица 2. Длина регенерантов *Larix sibirica* на среде с добавлением биопрепаратов растительного происхождения на 28-е сут культивирования

Источник пептидов	Концентрация, мкг/л	Длина, мм
Контроль	—	14.00 ± 0.70
Щирица запрокинутая	25	13.69 ± 0.68
	50	12.79 ± 0.64
	100	13.87 ± 0.69
	200	7.17 ± 0.72
	400	5.87 ± 0.59
	800	14.65 ± 0.73
Чернушка посевная	25	15.62 ± 0.78
	50	14.83 ± 0.74
	100	14.61 ± 0.73
	200	10.30 ± 0.52
	400	13.10 ± 0.66
	800	13.25 ± 0.66
Пырей удлинённый	25	12.89 ± 0.64
	50	14.56 ± 0.73
	100	14.58 ± 0.73
	200	8.87 ± 0.44
	400	7.37 ± 0.37
	800	9.50 ± 0.48

микробных (содержание липидпереносящих белков) свойствами ингибиторов протеиназ, а также прямым инсектотоксическим действием за счет наличия лектинов и ингибиторов гидролитических ферментов насекомых (Rinderle *et al.*, 1990; Hejgaard *et al.*, 1994; del Carmen Ramírez-Medeles *et al.*, 2003; Conforti *et al.*, 2005).

Пырей удлинённый *E. eliongata* в первую очередь исследовался как донор генов в традиционной селекции при создании полиплоидных форм культурных злаков, в частности пшеницы *Triticum aestivum* (He *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017), а также как источник генетического материала, обеспечивающего повышенную устойчивость к солевому стрессу (Colmer *et al.*, 2006). Характерно, что ранее не исследовался белково-пептидный состав данного вида (поиск и характеристика защитных белков и пептидов). Аналогичное заключение можно сделать и в отношении близкородственного вида *E. elongata* — злостного сорного растения *Agropyron repens*. Мы провели масс-спектрометрический анализ БПЭ колосьев пырея, в результате которого идентифицировали набор молекулярных масс в пептидном диапазоне (3.1–9.6 кДа). Хорошо известно, что у большинства защитных пептидов отмечена довольно определенная привязка к молекулярной массе. Это выражается в

Таблица 3. Развитие проростков *Larix sibirica* на среде для прорастания на 28-е сут культивирования

Источник пептидов	Концентрация, мкг/л	Морфогенный ответ*, %		
		каллус	ризогенез	регенерация без аномалий**
Контроль	—	35.0	48.0	22.0
Щирица запрокинутая	25	33.0	38.0	8.0
	50	48.0	44.0	8.0
	100	36.0	50.0	23.0
	200	25.0	55.0	35.0
	400	45.0	45.0	10.0
	800	25.0	85.0	65.0
Чернушка посевная	25	44.0	48.0	17.0
	50	33.0	29.0	14.0
	100	48.0	44.0	28.0
	200	45.0	55.0	15.0
	400	25.0	50.0	30.0
	800	15.0	60.0	45.0
Пырей удлинённый	25	29.0	54.0	38.0
	50	21.0	53.0	16.0
	100	50.0	38.0	17.0
	200	35.0	80.0	45.0
	400	30.0	55.0	30.0
	800	45.0	80.0	35.0

* Доля общего числа. Все значения округлены до целых чисел.

** Развитие всех доменов проростка без аномалий и каллусных наплывов: корешка, корневой шейки, гипокотыля, семядолей.



Рис. 4. Регенеранты Кл4 *Larix sibirica* на стадии прорастания на средах с добавлением биопрепаратов растительного происхождения на 28-е сут культивирования. а – контроль, базовая среда; б – ширица запрокинутая, 200 мкг/л; в – ширица запрокинутая, 400 мкг/л; г – ширица запрокинутая, 800 мкг/л; д – чернушка посевная, 200 мкг/л; е – чернушка посевная, 400 мкг/л; ж – чернушка посевная, 800 мкг/л; з – пырей удлинённый, 200 мкг/л; и – пырей удлинённый, 400 мкг/л; к – пырей удлинённый, 800 мкг/л. Окончание на следующей странице.



Рис. 4. Окончание.

том, что молекулы, принадлежащие к определенному семейству АМП, характеризуются достаточно узким диапазоном молекулярных масс. Наши данные позволяют предположить локализацию в колосьях пырея пептидов, принадлежащих к семействам растительных дефензинов, тионинов, липидпереносящих белков (подсемейства I и II), а также ряда ингибиторов гидролаз типа Боуман–Бирка, Кунитца и бифункциональных ингибиторов трипсина/ α -амилазы злаков. Дальнейшие исследования позволят выделить и структурно идентифицировать пептидные молекулы, в том числе обеспечивающие рострегулирующие свойства (сигнальную активность) при их аппликации на хвойных растениях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые получены соматические сеянцы лиственницы сибирской в результате обработки их пептидами растительного происхождения. Выявлено, что наличие в питательной среде АМП исследованных видов растений не ингибирует образование эмбрионных культур лиственницы сибирской.

Контрольные регенеранты и варианты, обработанные БПЭ, имели наплывы в области корня, гипокотыля, а также на границе корня и гипокотыля. АМП растительного происхождения не оказали стимулирующего эффекта. Дальнейшие наблюдения за ростом соматических сеянцев позволят определить устойчивость их к фитопатогенам при выращивании в теплице и в лесопитомнике.

Исследование выполнено в рамках бюджетного проекта ФГБНУ ИЛ СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН (проект № 0356-2017-0741) и при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда науки в рамках научных проектов № 16-44-240509 “Разработка биотехнологии получения устойчивых к грибным болезням и вредителям эмбрионных культур лиственницы сибирской с использованием защитных антимикробных пептидов *in vitro*” и № 18-44-243004 “Изучение влияния биологически активных пептидов растительного и микробного происхождения на рост и развитие хвойных *in vitro* в раннем онтогенезе”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Егоров Ц.А., Одинцова Т.И. Защитные пептиды иммунитета растений // Биоорганическая химия. 2012. Т. 38. № 1. С. 7–17.
- Круглова Н.Н., Егорова О.В., Сельдимирова Д.Ю., Зайцев Д.Ю., Зинатуллина А.Е. Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений: Ин-т биологии Уфимского НЦ РАН; ООО “Консалтин-

говая фирма “Микроскоп Плюс”. Уфа: Гилем, 2013. 128 с.

- Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1973. 343 с.
- Ощепкова Ю.И., Вешкурова О.Н., Рогожин Е.А., Мусолямов А.Х., Смирнов А.Н., Одинцова Т.И., Егоров Ц.А., Гришин Е.В., Салихов Ш.И. Выделение липидпереносящего белка Ns-LTP1 из семян чернушки посевной (*Nigella sativa*) // Биоорганическая химия. 2009. Т. 35. № 3. С. 344–349.
- Пак М.Э., Иваницкая А.С., Двойнина Л.М., Третьякова И.Н. Эмбриогенный потенциал длительно пролиферирующих клеточных линий *Larix sibirica in vitro* // Сиб. лес. журн. 2016. № 1. С. 27–38.
- Рогожин Е.А., Одинцова Т.И., Мусолямов А.Х., Смирнов А.Н., Бабаков А.В., Егоров Ц.А., Гришин Е.В. Выделение и характеристика нового липидпереносящего белка из зерновок ежовника обыкновенного (*Echinochloa crusgalli*) // Прикладная биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 4. С. 403–409.
- Третьякова И.Н. Способ микроклонального размножения лиственницы сибирской в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез в среде АИ для плантационного лесовыращивания. Патент РФ RU 2456344 С2. М.: Федеральная служба по интеллектуальной собственности, 2012.
- <http://www.freepatent.ru/images/patents/5/2456344/patent-2456344.pdf>
- Третьякова И.Н. Эмбрионные клеточные линии и соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* у лиственницы сибирской // Докл. РАН. 2013. Т. 450. № 1. С. 122.
- Третьякова И.Н., Барсукова А.В. Соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* трех видов лиственницы // Онтогенез. 2012. Т. 43. № 6. С. 425–425.
- Третьякова И.Н., Барсукова А.В. Соматический эмбриогенез лиственниц и кедра сибирского в Сибири // Лесоведение. 2015. № 6. С. 63–70.
- Третьякова И.Н., Пак М.Э. Соматический полиэмбриогенез *Larix sibirica* в эмбрионной культуре *in vitro* // Онтогенез. 2018. Т. 49. № 4. С. 1–13.
- 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.
- Broekaert W.F., Mariën W., Terras F.R., De Bolle M.F., Proost P., Van Damme J., Dillen L., Claeys M., Rees S.B., Vanderleyden J. Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins // Biochemistry. 1992. V. 31. № 17. P. 4308–4314.
- Cairney J., Pullman G.S. The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis // New Phytologist. 2007. V. 176. № 3. P. 511–536.
- Colmer T.D., Flowers T.J., Munns R. Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. № 5. P. 1059–1078.
- Conforti F., Statti G., Loizzo M.R., Sacchetti G., Poli F., Menichini F. *In vitro* antioxidant effect and inhibition of al-

- pha-amylase of two varieties of *Amaranthus caudatus* seeds // Biol. Pharm. Bull. 2005. V. 28. № 6. P. 1098–1102.
- De Bolle M.F., David K.M., Rees S.B., Vanderleyden J., Bruno P., Camue A., Broekaert W.F. Cloning and characterization of a cDNA encoding an antimicrobial chitin-binding protein from amaranth, *Amaranthus caudatus* // Plant. Mol. Biol. 1993. V. 22. № 6. P. 1187–1190.
- del Carmen Ramírez-Medeles M., Aguilar M.B., Miguel R.N., Bolaños-García V.M., García-Hernández E., Soriano-García M. Amino acid sequence, biochemical characterization, and comparative modeling of a nonspecific lipid transfer protein from *Amaranthus hypochondriacus* // Arch Biochem. Biophys. 2003. V. 415. № 1. P. 24–33.
- Egorov T.A., Odintsova T.I., Pukhalsky V.A., Grishin E.V. Diversity of wheat anti-microbial peptides // Peptides. 2005. V. 26. P. 2064–2073.
- He F., Xing P., Bao Y., Ren M., Liu S., Wang Y., Li X., Wang H. Chromosome pairing in hybrid progeny between *Triticum aestivum* and *Elytrigia elongata* // Front Plant Sci. 2017. V. 8. P. 2161.
- Hejgaard J., Dam J., Petersen L.C., Bjørn S.E. Primary structure and specificity of the major serine proteinase inhibitor of amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) seeds // Biochim. Biophys. Acta. 1994. V. 1204. № 1. P. 68–74.
- Klimaszewska K., Cyr D.R., Sutton B.C.S. Influence of gelling agents on culture medium gel strength, water availability, tissue water potential, and maturation response in embryogenic cultures of *Pinus strobus* L. // In vitro Cell. Develop. Biol. Plant. 2000. V. 36. № 4. P. 279–286.
- Klimaszewska K., Noceda C., Pelletier G., Label P., Rodriguez R., Lelu-Walter M.A. Biological characterization of young and aged embryogenic cultures of *Pinus pinaster* // In vitro Cell. Develop. Biol. Plant. 2008. V. 45. № 20. P. 20–33.
- Lelu M.A., Bastien C., Klimaszewska K., Ward C., Charest P.J. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix × leptoeuropaea*). Pt 1. Somatic embryo maturation // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 1994. V. 36. № 1. P. 107–115.
- Lelu-Walter M.A., Pâques L.E. Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix × Eurolepis* and *Larix × Marschlinsii*). Perspectives for breeding // Ann. For. Sci. 2009. V. 66. P. 104–114.
- Lelu-Walter M.A., Bernier-Cardou M., Klimaszewska K., Ward C., Charest P.J. Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2008. V. 92. № 1. P. 31–45.
- Lipkin A., Anisimova V., Nikonorova A., Babakov A., Krause E., Bienert M., Grishin E., Egorov T. An antimicrobial peptide Ar-AMP from amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds // Phytochemistry. 2005. V. 66. № 20. P. 2426–2431.
- Martins J.C., Maes D., Loris R., Pepermans H.A., Wyns L., Willem R., Verheyden P. NMR study of the solution structure of Ac-AMP2, a sugar binding antimicrobial protein isolated from *Amaranthus caudatus* // J. Mol. Biol. 1996. V. 258. № 2. P. 322–333.
- Odintsova T.I., Rogozhin E.A., Baranov Yu.V., Musolyamov A.Kh., Yalpani N., Egorov T.A., Grishin E.V. Seed defensins of barnyard grass *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv // Biochimie. 2008. V. 90. P. 1667–1673.
- Odintsova T.I., Vassilevski A.A., Slavokhotova A.A., Musolyamov A.K., Finkina E.I., Khadeeva N.V., Rogozhin E.A., Korostyleva T.V., Pukhalsky V.A., Grishin E.V., Egorov T.A. A novel antifungal hevein-type peptide from *Triticum kiharae* seeds with a unique 10-cysteine motif // FEBS J. 2009. V. 276. № 15. P. 4266–4275.
- Pullman G.S., Bucalo K. Chapter 19: Pine somatic embryogenesis using zygotic embryos as explants / Plant Embryo Culture // Meth. Protocols, Meth. Mol. Biol. 2011. V. 710. P. 267–291.
- Rinderle S.J., Goldstein I.J., Remsen E.E. Physicochemical properties of amaranthin, the lectin from *Amaranthus caudatus* seeds // Biochemistry. 1990. V. 29. № 46. P. 10555–10561.
- Rogozhin E.A., Oshchepkova Y.I., Odintsova T.I., Khadeeva N.V., Veshkurova O.N., Egorov T.A., Grishin E.V., Salikhov S.I. Novel antifungal defensins from *Nigella sativa* L. seeds // Plant Physiol. Biochem. 2011. V. 49. № 2. P. 131–137.
- Slavokhotova A.A., Odintsova T.I., Rogozhin E.A., Musolyamov A.K., Andreev Y.A., Grishin E.V., Egorov T.A. Isolation, molecular cloning and antimicrobial activity of novel defensins from common chickweed (*Stellaria media* L.) seeds // Biochimie. 2011. V. 93. № 3. P. 450–456.
- Slavokhotova A.A., Rogozhin E.A., Musolyamov A.K., Andreev Y.A., Oparin P.B., Berkut A.A., Vassilevski A.A., Egorov T.A., Grishin E.V., Odintsova T.I. Novel antifungal α -hairpinin peptide from *Stellaria media* seeds: structure, biosynthesis, gene structure and evolution // Plant Mol. Biol. 2014. V. 84(1–2). P. 189–202.
- Von Aderkas P., Anderson P. Aneuploidy and polyploidization in haploid tissue cultures of *Larix decidua* // Physiol. Plant. 1993. V. 88. № 1. P. 73–77.
- Von Aderkas P., Pattanavibool R., Hristoforoglu K., Ma Y. Embryogenesis and genetic stability in long term megagametophyte-derived cultures of larch // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2003. V. 75. № 1. P. 27–34.
- Yang Y., Fan X., Wang L., Zhang H.Q., Sha L.N., Wang Y.I., Kang H.Y., Zeng J., Yu X.F., Zhou Y.H. Phylogeny and maternal donors of *Elytrigia* Desv. sensu lato (*Triticeae*; *Poaceae*) inferred from nuclear internal-transcribed spacer and trnL-F sequences // BMC Plant Biol. 2017. V. 17. № 1. P. 207.

Application of Plant Antimicrobial Peptides to Production Embryogenic Cultures of *Larix sibirica*

I. N. Tretyakova^{1, 5, #}, E. A. Rogozhin^{2, 3, 4}, M. E. Park¹, I. A. Petukhova⁵, A. S. Shuklina¹,
A. P. Pahomova¹, and V. S. Sadykova³

¹*Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center SB RAS", Akademgorodok 50/28, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

²*Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, ul. Miklouho-Maclay 16/10, Moscow, 117997 Russia*

³*Gause Institute of New Antibiotics, ul. Bolshaya Pirogovskaya 11/1, Moscow, 119021 Russia*

⁴*Tyumen State University, ul. Volodarskogo 6, Tyumen, 625003 Russia*

⁵*Siberian Federal University, prosp. Svobodny 79, Krasnoyarsk, 660041 Russia*

[#]*e-mail: culture@ksc.krasn.ru*

The effect of plant antimicrobial peptides on the initiation of callus and embryonal-suspensor mass, the formation of somatic embryos and the germination of regenerants of Siberian larch was tested. As the objects of plant origin, protein-peptide extracts of *Amarantus retroflexus* (seeds), *Nigella sativa* (seeds), *Elytrigia elongata* (spikelets) were used. Peptides were introduced into the medium AI at the stage of initiation of embryogenic cultures and ½AI at the stage of germination of somatic embryos. The stimulation of the formation of embryogenic cultures of Siberian larch under the influence of peptides was revealed. No significant differences in control and experimental regenerants growth dynamics were observed. It is assumed that the conducted studies can increase the immunity of cloned planting stock of Siberian larch.