

УДК 633.16:57.085.23:57.042

## СОДЕРЖАНИЕ ЭНДОГЕННЫХ ГОРМОНОВ В ЭКСПЛАНТАХ И КАЛЛУСАХ *LAVANDULA ANGUSTIFOLIA* MILL. НА НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO*

© 2024 г. Н. Н. Круглова\*, \*\*, @, И. Р. Галин\*\*, Н. А. Егорова\*

\*НИИ сельского хозяйства Крыма, ул. Киевская, 150, Симферополь, 295043 Россия

\*\*Уфимский Институт биологии – обособленное структурное подразделение УФИЦ РАН, Россия,  
просп. Октября, 69, Уфа, 450054 Россия

@E-mail: kruglova@anrb.ru

Поступила в редакцию 13.12.2023 г.

После доработки 07.02.2024 г.

Принята к публикации 25.03.2024 г.

Методом иммуноферментного анализа впервые для *Lavandula angustifolia* Mill. изучено содержание эндогенных гормонов (ауксин ИУК, цитокинины, АБК) в эксплантах различных типов (сегменты листа, почки, стебля), индуцированных из них первичных каллусах, а также морфогенных и неморфогенных каллусах на начальных этапах культивирования *in vitro*. Показано максимальное значение уровней гормонов в таких эксплантах, как сегменты почек. Выявлено повышение содержания гормонов в первичных каллусах в сравнении с аналогичными показателями во всех типах эксплантов. В морфогенных каллусах в сравнении с неморфогенными отмечен более высокий уровень активной формы цитокинина (транс-зеатин) и АБК, а также более низкий уровень неактивной формы цитокинина (зеатин-нуклеотид) и ауксина ИУК. Высказано мнение о том, что содержание эндогенных гормонов в эксплантах и каллусах *L. angustifolia* обусловлено их гистологическим статусом. Сделан вывод о единых гистофизиологических механизмах каллусо- и морфогенеза *in vitro* у изученного растения.

**Ключевые слова:** каллус *in vitro*, морфогенез, ауксины, цитокинины, абсцизовая кислота, лаванда узколистная *Lavandula angustifolia* Mill

**DOI:** 10.31857/S1026347024050018, **EDN:** ulyulg

Каллус *in vitro* определяется как интегрированная система тканей, возникшая в результате неорганизованной пролиферации дедифференцированных клеток эксплантов (Ikeuchi *et al.*, 2022). Как правило, различают морфогенные каллусы, компетентные клетки которых в оптимальных условиях культуры *in vitro* способны к дальнейшему морфогенезу по различным путям, и неморфогенные каллусы, не способные к таким процессам.

Особый интерес вызывают морфогенные каллусы как экспериментальные модельные системы для изучения закономерностей и особенностей морфогенеза в интактных растениях (Feher, 2023; Kruglova *et al.*, 2023). Кроме того, на основе использования морфогенных каллусов разработаны биотехнологии получения полноценных регенерантов ценных культур (обобщение: Efferth, 2019).

Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что образование каллусов и морфогенез *in vitro* в них определяются комплексом взаимосвязанных факторов при главенствующей роли экзогенных гормонов, внесенных в состав

культуральной среды. Разработка этой проблемы на примере ауксинов и цитокининов была начата еще в 1950-е гг. (Skoog, Miller, 1957). К настоящему времени ведущая роль экзогенных полифункциональных ауксинов и цитокининов в индукции формирования каллусов и реализации различных морфогенетических программ развития клеток каллусов *in vitro* подтверждена во многих работах, выполненных на примере растений из различных семейств (Raspog *et al.*, 2021). В ряде работ показано принципиальное значение оптимального баланса между концентрацией экзогенных ауксинов и цитокининов и их эндогенным содержанием в эксплантах (при индуцировании формирования каллусов) и каллусах (в процессах морфогенеза *in vitro*) (Круглова, 2022). В последние годы исследователи уделяют большое внимание абсцизовой кислоте (АБК) – гормону, также характеризующемуся воздействием на различные аспекты морфогенеза в каллусах *in vitro* (Круглова и др., 2018; Bidabadi, Jain, 2020). В целом, ауксины, цитокинины и АБК следует отнести к ведущим гормонам каллусо- и морфогенеза *in vitro*.

Все рассмотренные выше вопросы вызывают большой теоретический и практический интерес. В то же время исследования, посвященные выявлению содержания эндогенных ауксинов, цитокининов и АБК в эксплантах и каллусах, сравнительно немногочисленны (публикации последних лет: Hisano *et al.*, 2016; Seldimirova *et al.*, 2019; Mostafa *et al.*, 2020), а сравнительный анализ уровней этих гормонов в исходных эксплантах и формирующихся из них каллусах различных типов в доступной литературе отсутствует.

Объектом данного исследования явилась лаванда узколистная *Lavandula angustifolia* Mill. – эфиромасличное растение, широко используемое в фармакологии, парфюмерии, косметике (Salehi *et al.*, 2018). Для этого ценного растения разработан ряд биотехнологий получения регенерантов через этап формирования каллусов с последующей индукцией морфогенеза *in vitro* в них (Leelavathi *et al.*, 2020; Егорова, 2021). Нами начаты исследования содержания ряда эндогенных гормонов в каллусах *L. angustifolia* сорта Вдала (Егорова *et al.*, 2020). Так, выявлено, что полученные из листовых эксплантов морфогенные каллусы 4 пассажа, в сравнении с неморфогенными каллусами того же пассажа, характеризовались более высоким содержанием цитокининов и более низким содержанием ауксина индол-3-уксусной кислоты (ИУК) и АБК. В то же время необходимо вести дальнейшие исследования в этом направлении, с привлечением других биотехнологически перспективных сортов *L. angustifolia*. Особенно большое значение могут иметь данные об эндогенном содержании этих гормонов в каллусах на самых начальных этапах культивирования *in vitro*, что может во многом определить приемы регуляции морфогенетического потенциала клеток каллусов в конкретной клеточной технологии.

В связи с этим целью данного исследования состояла в сравнительном анализе содержания эндогенных гормонов (ауксин ИУК, цитокинины, АБК) в различных эксплантах *L. angustifolia*, полученных из них первичных каллусах, а также морфогенных и неморфогенных каллусах на начальных этапах культивирования *in vitro*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили растения лаванды узколистной *Lavandula angustifolia* Mill. сорта Степная, выращенные в условиях закрытого грунта при температуре 22–24 °С, освещенности 3–5 клк и 16-часовом фотопериоде.

Применяли методы культуры *in vitro* органов растений как общепринятые (Калинин и др., 1980), так и разработанные авторами для различных клеточных технологий лаванды узколистной (Егорова, 2021).

В качестве эксплантов использовали сегменты листьев, стеблей и почек донорных растений. Экспланты стерилизовали в 70% этаноле (40 с) и 50% растворе препарата Брадофен 10Н (ФЛОРИН АО, Венгрия) (12 мин) и трижды промывали автоклавируемой дистиллированной водой. Асептические работы проводили в условиях ламинарного бокса БАВнп-01-Ламинар-С-1,2 (Lamsystems, Россия).

Для получения первичных каллусов экспланты помещали на агаризованную питательную среду, содержащую макро-, микросоли и витамины по прописи Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962) с добавлением  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты (НУК, Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1.0 мг/л и 6-бензиламинопурина (БАП, Sigma-Aldrich, США) в концентрации 0.5 мг/л (среда МС160, по: Егорова, 2021). Культивирование эксплантов проводили в пробирках при температуре 26±2°С, относительной влажности воздуха 70%, освещенности 2–3 клк, 16-часовом фотопериоде.

Через 4–6 недель культивирования первичные каллусы отделяли от эксплантов и переносили в пробирки на агаризованные среды различного состава. Неморфогенные каллусы получали на среде МС160 (состав среды приведен выше), морфогенные каллусы – на среде МС594 (среда составлена по прописи Мурасиге и Скуга с добавлением БАП в концентрации 0.5 мг/л и 0.5 мг/л тидиазурана (ТДЗ, Sigma, USA), по: Егорова, 2021). Каллусные транспланты при указанных выше физических условиях культивировали в течение 4–6 недель для получения и наращивания массы каллусов 1 пассажа.

Количественное содержание эндогенных гормонов (ИУК, цитокинины, АБК) выявляли методом иммуноферментного анализа (ИФА) в эксплантах перед их введением в асептическую культуру *in vitro*, первичных каллусах после отделения их от эксплантов, а также в морфогенных и неморфогенных каллусах 1 пассажа в конце цикла выращивания (30–35 сут). Навески растительного материала объединяли так, чтобы у эксплантов каждого типа их общая масса составила 2–3 г, у каллусов каждого типа – 5–6 г.

Навески помещали в пенициллиновые флаконы и замораживали в низкотемпературном морозильнике Thermo Scientific Forma 900 (Thermo Scientific, США) при -80°С. Далее флаконы переносили в камеру лиофилизатора FreeZone 2.5 L (Labconco, США) и проводили сублимационную сушку при -50°С и уровне вакуума 0.1 мБар в течение 3 сут. После лиофильной сушки флаконы с материалом хранили при 4°С в фармацевтическом холодильнике НУС-580 (Haier, США). Далее лиофилизированный материал гомогенизировали, экстрагировали 70% этанолом и инкубировали в фармацевтическом холодильнике НУС-580 (Haier, США) при 4°С в течение 12 ч. Проводили фильтрацию гомогенизата

с помощью бумажных фильтров для отделения жидкой фазы и дальнейшее упаривание фильтрата до водного остатка.

Экстракцию ИУК и АБК из аликвоты водного остатка проводили по модифицированной схеме с уменьшением объема (Vysotskaya *et al.*, 2008). Экстракцию проводили диэтиловым эфиром и метилировали диазометаном. Полученную эфирную фазу упаривали до сухого остатка, который далее восстанавливали 80% этанолом, его аликвоту в серии разведений добавляли в лунки планшетов и проводили ИФА в тест-системах с использованием антител, специфичных к ИУК и АБК.

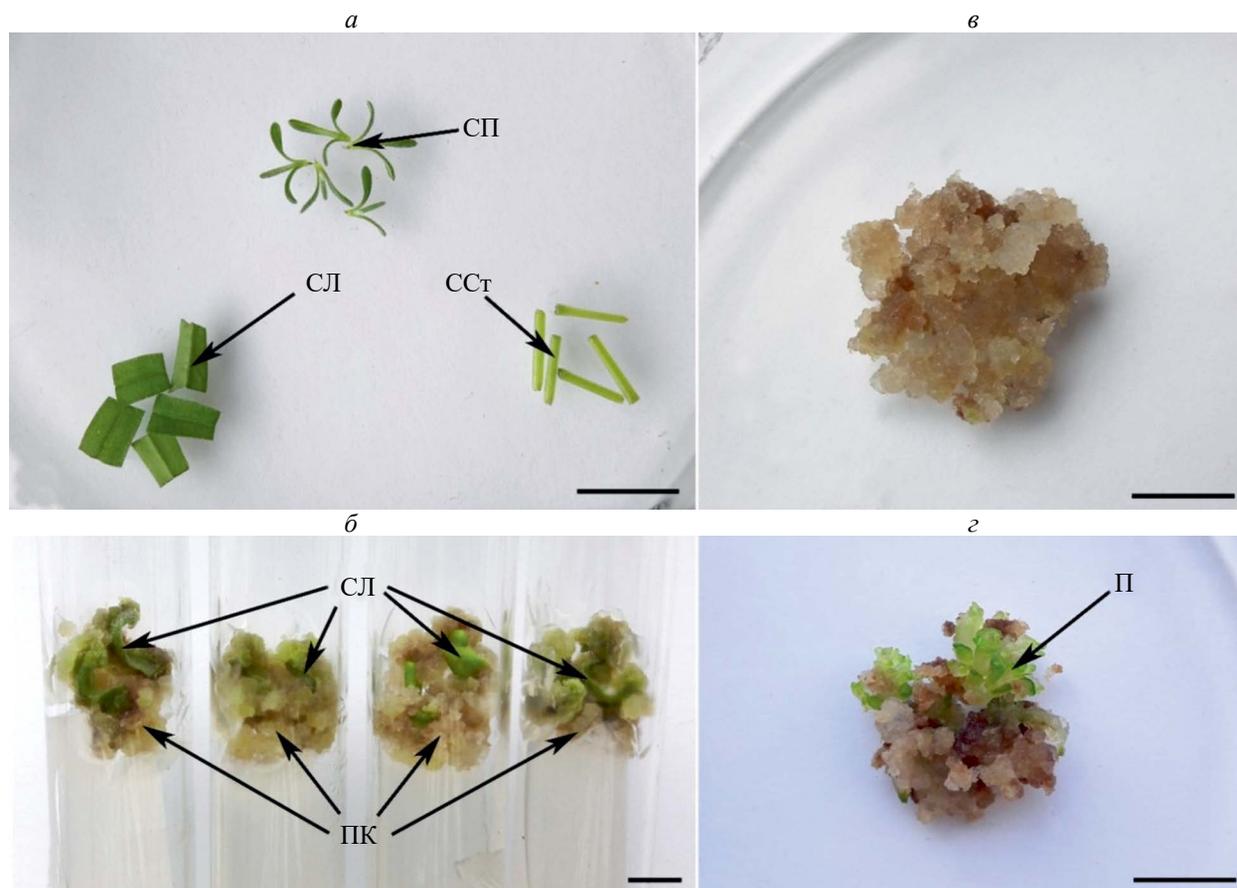
Содержание цитокининов определяли по (Kudoyarova *et al.*, 2014). Для этого цитокинины из водного остатка концентрировали на картридже C18 (Sep-Pak Classic C18) и элюировали этанолом, далее выпаривали в ротационном испарителе. Сухой остаток восстанавливали в 80% этаноле и наносили на пластины силикагеля тонкослойной хроматографии для разделения метаболитов цитокининов. Различные формы цитокининов (транс-зеатин, зеатин-рибозид,

зеатин-нуклеотид) элюировали из соответствующих зон фосфатным буфером, затем аликвоту в серии разведений добавляли в лунки планшетов и проводили ИФА в тест-системах с использованием антител, специфичных к зеатину.

Каждый вариант опыта анализировали в 3–5-кратной повторности. Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением программы Microsoft Office Excel 2010. На рисунках представлены средние арифметические значения и ошибки средних. Достоверность различий определяли с помощью t-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксплантами (рис. 1а) послужили сегменты листьев, стеблей и почек растений *L. angustifolia*. На рис. 2 представлены результаты выявления содержания ИУК, АБК и цитокининов в различных эксплантах после их отделения от донорных



**Рис. 1.** Экспланты (а), первичные каллусы (б), неморфогенные (в) и морфогенные (г) каллусы 1 пассажа *L. angustifolia*, полученные из различных эксплантов. Условные обозначения: П – почка, ПК – первичный каллус, СЛ – сегмент листа, СП – сегмент почки, ССт – сегмент стебля. Масштаб: 10 мм.

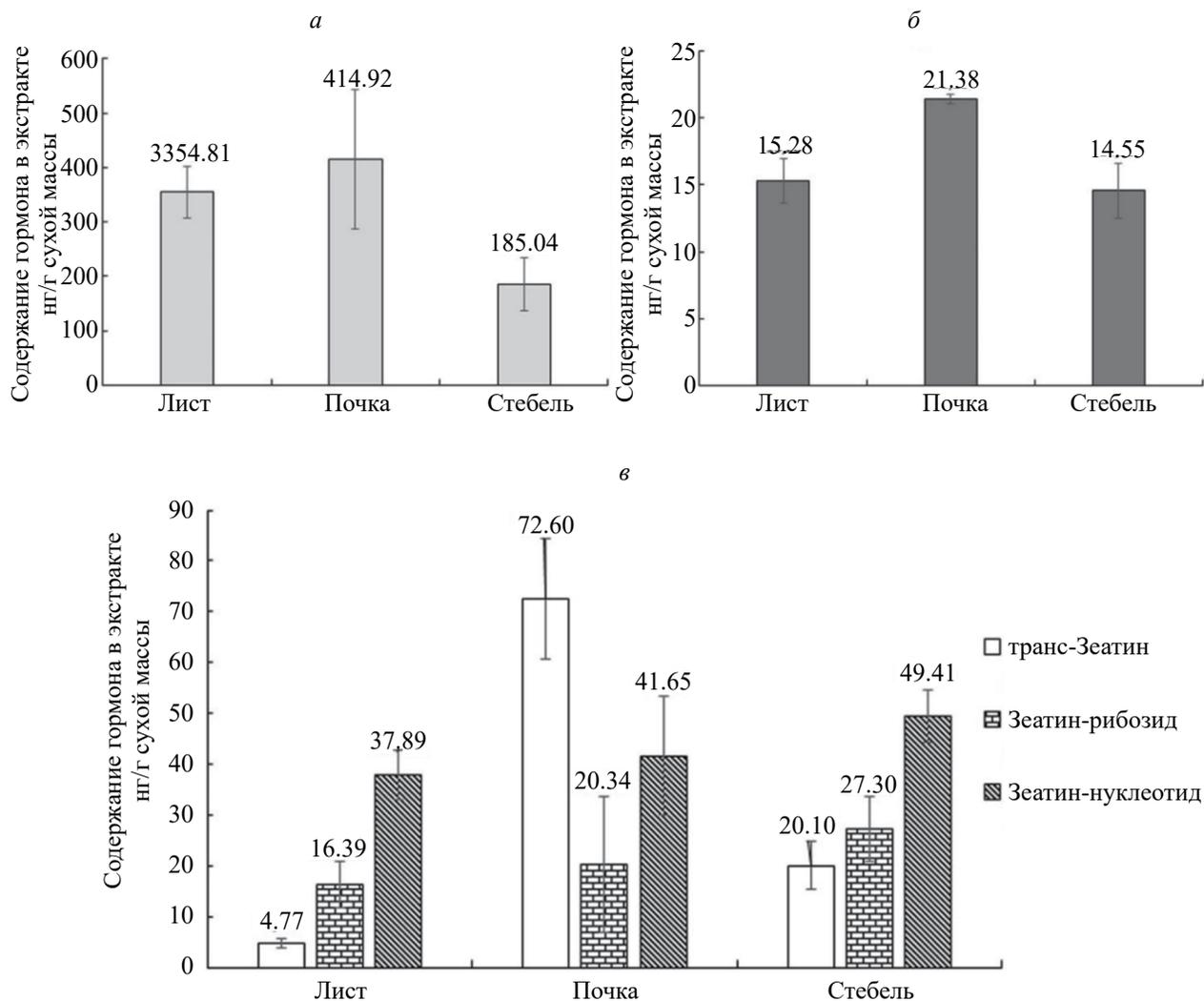


Рис. 2. Содержание эндогенных гормонов в различных эксплантах *L. angustifolia*: а – ИУК, б – АБК, в – цитокинины.

растений, перед инокуляцией на питательную среду. Максимальные из выявленных уровни ИУК (414.92 нг/г) и АБК (21.38 нг/г) отмечены в сегментах почек, тогда как в сегментах листьев/стеблей эти показатели ниже: ИУК 354.81/185.04 нг/г, АБК 15.28/14.55 нг/г, соответственно. Что касается цитокининов, то показатель транс-зеатина в сегментах почек (72.60 нг/г) значительно превышает аналогичные показатели в сегментах листьев/стеблей (4.77/20.10 нг/г, соответственно), тогда как уровни остальных форм цитокининов примерно одинаковы, при некотором повышении показателей в сегментах стеблей. Так, показатели зеатин-рибозида/зеатин-нуклеотида составили в сегментах стеблей 27.30/49.41 нг/г, в сегментах листьев 16.39/20.34 нг/г и 37.89/41.65 нг/г, соответственно.

Первичные каллусы *L. angustifolia* формировались на поверхности различных эксплантов

через 2–3 недели после введения в культуру *in vitro* на питательную среду. По морфологическим показателям первичные каллусы представляли собой рыхлые недифференцированные образования со множеством инвагинаций, как это показано на примере таких каллусов, полученных из сегментов листа (рис. 1б). Результаты выявления содержания эндогенных ИУК, АБК и цитокининов в первичных каллусах представлены на рис. 3. Их анализ свидетельствует о примерно равных уровнях ИУК (2806.50 нг/г, 2563.60 нг/г, 3189.54 нг/г) и АБК (82.33 нг/г, 98.52 нг/г, 88.99 нг/г) в каллусах, полученных из различных эксплантов (лист, почка, стебель, соответственно). В то же время выявлено значительное повышение показателя цитокинина зеатин-нуклеотида в каллусах, полученных из сегментов стеблей (377.15 нг/г), в сравнении с аналогичными показателями в каллусах, полученных

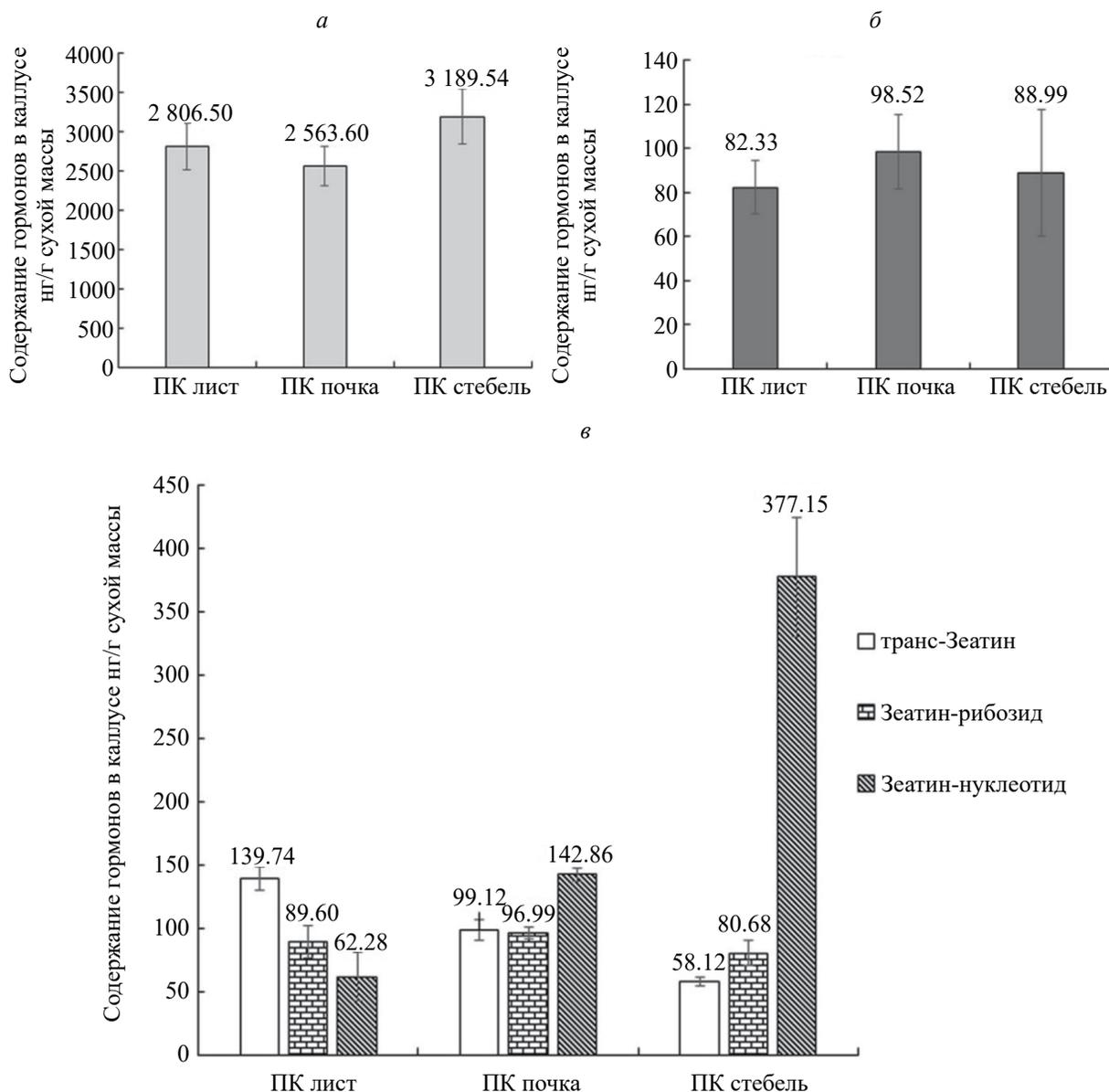


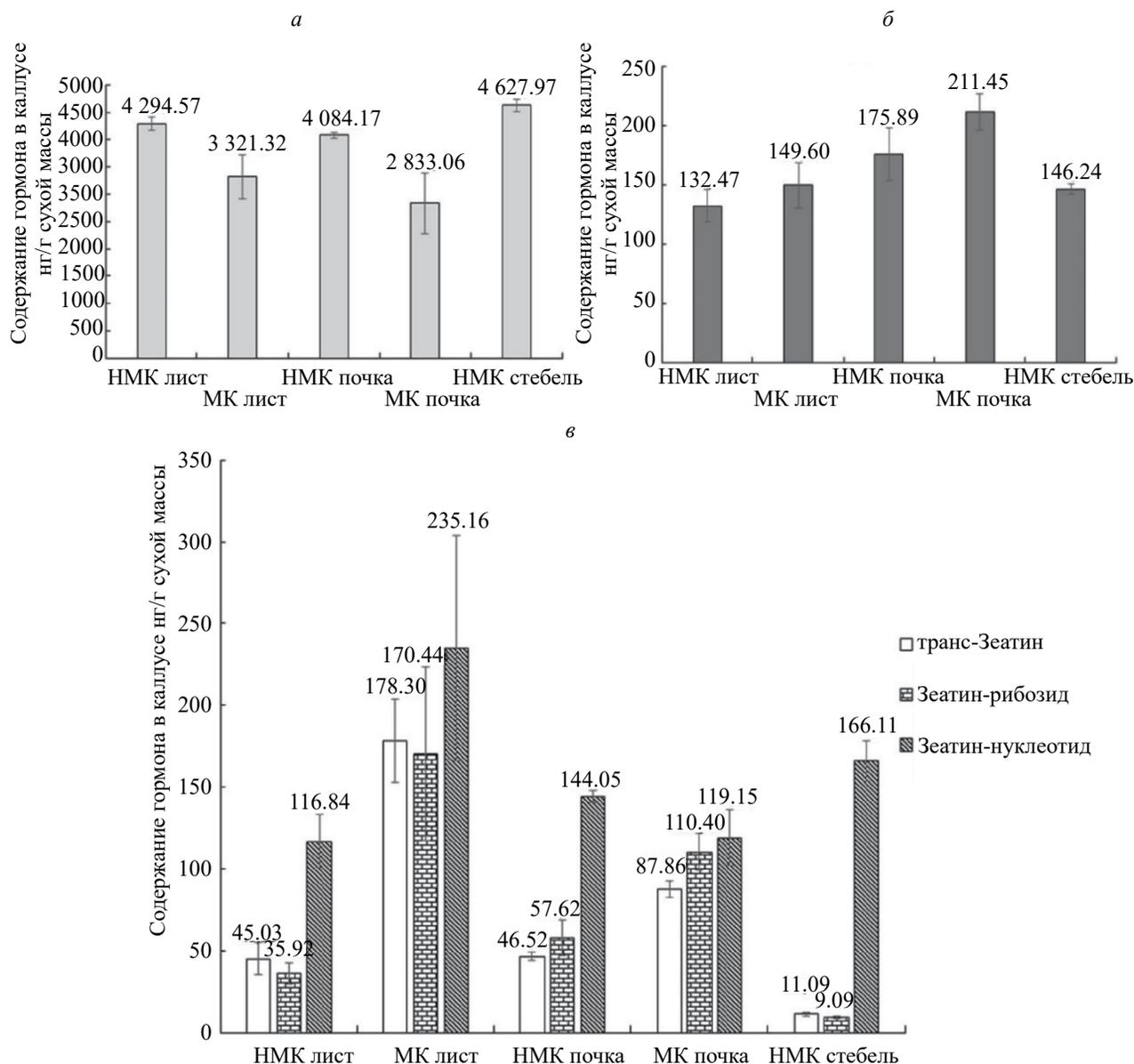
Рис. 3. Содержание эндогенных гормонов в первичных каллусах *L. angustifolia*, полученных из различных эксплантов: а – ИУК, б – АБК, в – цитокинины.

из сегментов почек (142.86 нг/г) и особенно сегментов листьев (62.28/ нг/г).

Через 4–6 недель первичные каллусы отделяли от эксплантов и для получения неморфогенных каллусов переносили на свежую среду МС160. Проллиферирующие в таких условиях каллусы культивировали в течение 5–6 недель до стационарной фазы роста (1 пассаж). По морфологическим данным неморфогенные каллусы 1 пассажа, как и первичные каллусы, характеризовались рыхлой структурой и наличием множества инвагинаций на своей поверхности (рис. 1в). Для получения морфогенных каллусов первичные каллусы

переносили на среду МС594 и культивировали в течение 5–6 недель для получения и наращивания массы каллусов (1 пассаж). По морфологическим данным, морфогенные каллусы 1 пассажа характеризовались наличием на их поверхности почек (рис. 1г) и листьев. Следует отметить, что в условиях выполненных экспериментов морфогенные каллусы 1 пассажа были получены из первичных каллусов, индуцированных из листа и почки, но не стебля.

Показатели содержания эндогенных ИУК, АБК и цитокининов в неморфогенных и морфогенных каллусах 1 пассажа отражены на рис. 4.



**Рис. 4.** Содержание эндогенных гормонов в морфогенных и неморфогенных каллусах 1 пассажа *L. angustifolia*, полученных из различных эксплантов: а – ИУК, б – АБК, в – цитокинины. Примечание: данные по содержанию эндогенных гормонов в морфогенных каллусах 1 пассажа, полученных из стебля, отсутствуют, пояснение в тексте.

Как свидетельствует их анализ, в морфогенных каллусах выявлено более низкое содержание ИУК по сравнению с неморфогенными: соответственно, 3321.32 нг/г и 4294.57 нг/г при использовании сегментов листьев, 2833.06 нг/г и 4084.17 нг/г при использовании сегментов почек. В то же время уровни АБК выше в морфогенных каллусах по сравнению с неморфогенными, при всех использованных эксплантах: 149.6 нг/г против 132.47 нг/г при использовании сегментов листьев, 211.45 нг/г против 175.89 нг/г при использовании сегментов почек.

В морфогенных каллусах, полученных из сегментов листьев, в сравнении с неморфогенными каллусами аналогичного происхождения, выявлены и более высокие уровни всех изученных форм цитокинина. Так, показатель зеатин-нуклеотида в морфогенных каллусах превышает аналогичный показатель неморфогенных каллусов почти вдвое (235.16 нг/г и 116.84 нг/г, соответственно), показатель транс-зеатина – почти вчетверо (178.30 нг/г и 45.03 нг/г), показатель зеатин-рибозида – почти впятеро (170.44 нг/г и 35.92 нг/г соответственно). Эта тенденция сохраняется и в морфогенных каллусах,

полученных из сегментов почек: показатели транс-зеатина (87.86 нг/г) и зеатин-рибозида (110.40 нг/г) выше аналогичных показателей неморфогенных каллусов (46.52 нг/г и 57.56 нг/г, соответственно). Однако в таких морфогенных каллусах отмечен более низкий (119.15 нг/г) уровень зеатин-нуклеотида в сравнении с неморфогенными каллусами (144.05 нг/г).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В качестве эксплантов для получения каллусов используют различные части донорных растений. Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что наибольший “выход” первичных каллусов достигается, как правило, при введении в культуру *in vitro* органов на ранних стадиях развития (Зинатуллина, 2021; Kruglova *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021; Kharel *et al.*, 2022). Это эмпирическое наблюдение можно объяснить гистологическим статусом таких эксплантов — наличием в них меристематических или еще слабо специализированных клеток, способных к переходу в состояние дедифференциации, последовательным делениям с пролиферацией дедифференцированных клеток, т.е. формированию каллуса (Feher, 2019; Kruglova, 2022). Каллусообразование связано со структурной перестройкой инициальных клеток эксплантов при участии ряда генов (*YUC1*, *YUC4*, *WOX5*, *WOX11* и др.) (Ikeuchi *et al.*, 2019; Feher, 2023). Большую роль в этом процессе играет гормональный статус эксплантов на ранних стадиях развития и особенно наличие важнейших гормонов морфогенеза — ауксинов, цитокининов, АБК (Bidabadi, Jain, 2020).

Анализ содержания эндогенных гормонов в эксплантах *L. angustifolia* подтверждает эти наблюдения. Так, максимальный из выявленных уровень ИУК, АБК и особенно цитокинина транс-зеатина отмечен в сегментах почек — активно развивающихся структур, тогда как в сегментах специализированных структур — листьев и стеблей — показано пониженное содержание этих гормонов (рис. 2). Эти результаты согласуются с полученными нами данными о том, что у *L. angustifolia* именно почки характеризовались наибольшей в сравнении с листьями и стеблями частотой формирования первичных каллусов, причем на более широком спектре питательных сред (неопубл. данные).

Безусловно, было бы интересно исследовать содержание эндогенных гормонов в тех органах интактных растений *L. angustifolia*, сегменты которых послужили эксплантами при проведении экспериментов, и сравнить полученные показатели с аналогичными показателями эксплантов. Однако такого рода исследования оказались невозможными из-за отсутствия доступных методик. В то же время, исходя из общих подходов, можно полагать, что

содержание, например, АБК в изученных эксплантах повышено в сравнении с органами интактных растений. Действительно, АБК определяется как “гормон стресса” (Fidler *et al.*, 2022), а отделение органа от донорного растения расценивается как своеобразный раневой стресс (Feher, 2023; Kruglova *et al.*, 2023). В целом, влияние гормональных сигналов в эксплантах на стрессовую индукцию образования каллуса *in vitro* вызывает большой интерес исследователей, во многом обусловленный раневой регенерацией органов интактных растений, на начальных этапах также состоящей в формировании каллуса (Ikeuchi *et al.*, 2022).

Повышение уровней АБК в эксплантах *L. angustifolia* может быть также обусловлено наличием значительного количества вторичных метаболитов в интактных растениях этого объекта (Salehi *et al.*, 2018; Егорова, 2021). Так, в работе Донг с соавт. (Dong *et al.*, 2022) показано влияние фактора транскрипции *LaMYC4*, ответственного за биосинтез терпеноидов у *L. angustifolia*, на увеличение содержания АБК в трансгенных сверхэкспрессирующих терпеноиды растениях табака. В целом, влияние различных вторичных метаболитов в эксплантах на процессы каллусогенеза *in vitro* продемонстрировано для многих растений (Ozyigit *et al.*, 2023).

Сравнение уровней эндогенных гормонов во всех типах эксплантов (рис. 2) и полученных из них первичных каллусах (рис. 3) свидетельствует о повышении абсолютного значения всех показателей именно в каллусах. Такие результаты, по нашему мнению, обусловлены наращиванием массы первичных каллусов в течение достаточно длительного (4–6 недель) культивирования *in vitro*, что сопровождается их значительной пролиферацией, а значит, гистологическими изменениями. Особенно значительный рост отмечен в показателях содержания цитокинина зеатин-нуклеотида: уровень этого гормона в первичных каллусах, полученных из стеблей (рис. 3в), превышал аналогичный показатель в исходных эксплантах (рис. 2в) более чем в 70 раз и намного превышал аналогичные показатели в каллусах, полученных из листьев и почек (рис. 3в). В работе, выполненной с использованием анализа транскриптома и количественного гормонального анализа, показано, что в интактных растениях *Arabidopsis thaliana* ранение стебля, индуцирующее формирование каллуса, изменяет экспрессию генов, участвующих в биосинтезе цитокининов, что приводит к повышенному накоплению этих гормонов (Ikeuchi *et al.*, 2017). Возможно, и в случае с первичными каллусами *L. angustifolia* работает тот же механизм.

В результате проведенных экспериментов из первичных каллусов получены два контрастных типа каллусов I пассажа — неморфогенный и морфогенный, различающиеся по морфологическим показателям (ср. рис. 1в и рис. 1г). Важно

подчеркнуть, что контрастные типы каллусов I пассажа *L. angustifolia* отличаются и по гистологическим показателям, как это установлено нами ранее (Круглова и др., 2024). Так, неморфогенные каллусы представлены паренхимной тканью, тогда как в морфогенных каллусах выявлены такие пути морфогенеза *in vitro*, как органогенез *de novo* (листовые почки на разных стадиях геммо/каулогенеза) и соматический эмбриогенез *in vitro* (соматические зародыши на ранних стадиях эмбриогенеза). Кроме того, в толще морфогенных каллусов отмечены многочисленные морфогенетические очаги – группы недифференцированных меристематических клеток, которые постепенно преобразуются в меристемы будущих побегов и органов соматических зародышей. Такие морфогенетические очаги расцениваются как гистологическая основа путей морфогенеза *in vitro* в каллусах (Зинатуллина, 2023; Kruglova *et al.*, 2023).

Анализ содержания эндогенных гормонов в морфогенных и неморфогенных каллусах I пассажа *L. angustifolia* показал следующее.

В морфогенных каллусах в сравнении с неморфогенными отмечен более высокий уровень активной формы цитокинина – транс-зеатина, при использовании листовых эксплантов. Содержание этой формы цитокинина в морфогенном каллусе почти вчетверо превышало его содержание в неморфогенном (рис. 4в). Повышенное содержание этой активной формы цитокинина может быть объяснено морфогенетической активностью морфогенных каллусов, формированием и развитием в них множественных морфогенетических очагов, соматических зародышей и особенно органов – почек. Именно эндогенные цитокинины считаются основными кандидатами на получение специализированных генных сигналов постэмбрионального органогенеза *de novo*, главным образом специфичного для почек гомеодоменного регулятора *WUSCHEL* (Smeringai *et al.*, 2023). В то же время в неморфогенных каллусах, полученных из сегментов почек, отмечен более высокий уровень зеатин-нуклеотида в сравнении с морфогенными каллусами. Поскольку зеатин-нуклеотид относят к неактивной форме цитокининов, то эти данные лишней раз подтверждают неморфогенную природу таких каллусов.

В морфогенных каллусах выявлено более низкое содержание эндогенного ауксина ИУК по сравнению с неморфогенными, при использовании в качестве эксплантов как сегментов листьев, так и сегментов почек (рис. 4а). Такой результат может быть обусловлен гормональными особенностями выявленных в морфогенных каллусах путей морфогенеза – органогенеза *de novo* и соматического эмбриогенеза *in vitro*. Полагают, что в процессе органогенеза в каллусах эндогенные ауксины в целом играют не такую большую роль, как эндогенные цитокинины (Raspog *et al.*, 2021). Более того, ингибирование биосинтеза и полярного транспорта

эндогенного ауксина ИУК в каллусах *Arabidopsis thaliana* приводило к повышению регенерации органов *de novo* (Ohbayashi *et al.*, 2022).

В то же время именно эндогенные ауксины важны при таком пути морфогенеза в каллусах, как соматический эмбриогенез *in vitro* (Wojcik *et al.*, 2020). Однако потребность в эндогенных ауксинах возникает главным образом на поздних стадиях развития соматических зародышей *in vitro*, как это показано на примере *Arabidopsis thaliana* (Karami *et al.*, 2023). Полученные нами результаты подтверждают это наблюдение, поскольку развитие соматических зародышей *L. angustifolia* в морфогенных каллусах I пассажа останавливалось на достаточно ранней сердечковидной стадии (Круглова и др., 2024), что, по-видимому, и обусловило сравнительно невысокий уровень в них ауксина ИУК.

С формированием и развитием соматических зародышей следует связать и уровни эндогенной АБК в морфогенных каллусах I пассажа *L. angustifolia*. Как свидетельствуют полученные результаты, показатели содержания эндогенной АБК выше в морфогенных каллусах по сравнению с аналогичными показателями неморфогенных каллусов, при всех использованных эксплантах (рис. 4б). Возможно, в данном случае повышение содержания АБК обусловлено ролью этого “гормона стресса” в формировании и развитии соматических зародышей, поскольку в работах последних лет соматический эмбриогенез *in vitro* рассматривается как ответная стрессовая реакция экспланта на раннее повреждение (Spinoso-Castillo, Bello-Bello, 2022).

Следует подчеркнуть, что важное направление современных исследований состоит в изучении синергетического/антагонистического влияния (в англоязычной литературе: crosstalk) эндогенных гормонов в регуляции путей морфогенеза в каллусных культурах *in vitro*. Установлено, например, что в каллусах пшеницы и ячменя способность к соматическому эмбриогенезу *in vitro* определялась балансом содержания в них эндогенных ИУК и АБК (Seldimirova *et al.*, 2019). В каллусах *Fouquieria splendens* (Salinas-Patino *et al.*, 2018) и *Brassica juncea* (Lu *et al.*, 2020) цитокинин влиял на экспрессию ряда генов в сигнальных путях ауксина. В каллусах *Arabidopsis thaliana* ранние стадии формирования примордиев побегов зависели от сигналов ауксина, тогда как формирование апикальной меристемы побега на более поздних стадиях развития примордиев регулировалось цитокинином, однако под влиянием ауксиновой сигнализации (Cosic, Raspog, 2022).

Такого рода исследования по отношению к *L. angustifolia* еще предстоит выполнить, поскольку выявленные абсолютные величины показателей содержания изученных эндогенных гормонов в каллусах, скорее всего, играют не такую важную роль, как их взаимное влияние.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые полученные для *L. angustifolia* результаты подтверждают представленные в литературе данные об активном участии эндогенных гормонов (ауксин ИУК, цитокинины и АБК) как в индукции каллусообразования из различных типов эксплантов, так и в каллусогенезе на начальных этапах культивирования *in vitro*.

Сравнительный анализ уровней изученных эндогенных гормонов свидетельствует (1) о максимальном их значении в таких эксплантах, как сегменты почек; (2) о повышении их содержания в первичных каллусах в сравнении с эксплантами; (3) о более высоком уровне активной формы цитокинина (транс-зеатин) и АБК, а также более низком уровне неактивной формы цитокинина (зеатин-нуклеотид) и ауксина ИУК в морфогенных каллусах 1 пассажа в сравнении с неморфогенными того же пассажа. По нашему мнению, содержание изученных гормонов в эксплантах, первичных каллусах, а также морфогенных и неморфогенных каллусах *L. angustifolia* напрямую обусловлено их гистологическим статусом. В целом, можно говорить о единых гистофизиологических механизмах каллусо- и морфогенеза *in vitro* у изученного растения.

## БЛАГОРАДНОСТИ

Исследования выполнены на базе Центра коллективного пользования “Агидель” УФИЦ РАН, а также лаборатории биотехнологии НИИСХ Крыма.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 23-24-00023.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Егорова Н.А. Биотехнология эфиромасличных растений: создание новых форм и микроразмножение *in vitro*. Симферополь: ИД “Автограф”, 2021. 315 с.
- Зинатуллина А.Е. Структурные особенности клеток эксплантов *in vivo* и формирование морфогенных каллусов *in vitro* (обзор) // Биомика. 2021. Т. 13. № 1. С. 8–19.  
DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-2.
- Зинатуллина А.Е. Формирование морфогенетических очагов как основа гемморизогенеза *in vitro* в зародышевых каллусах пшеницы // Экобиотех. 2023. Т. 6. № 2. С. 81–90.  
DOI: 10.31163/2618-964X-2023-6-2-81-90.
- Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии. Киев: Наукова думка, 1980. 468 с.
- Круглова Н.Н. Каллусообразование и каллусогенез *in vitro* у злаков: роль гормонального баланса // Изв. Уфимск. науч. центра РАН. 2022. № 1. С. 52–59.  
DOI: 10.31040/2222-8349-2022-0-1-52-59.
- Круглова Н.Н., Зинатуллина А.Е., Егорова Н.А. Морфогенез *in vitro* в каллусах лаванды узколистистой *Lavandula angustifolia* Mill.: гистологические аспекты // Изв. РАН. Сер. биол. 2024. № 3. С. 297-306. EDN: VBERNU.  
DOI: 10.31857/S1026347024030014.
- Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е., Веселов Д.С. Абсцизовая кислота в системах культуры *in vitro* эксплантов // Изв. Уфимск. науч. центра РАН. 2018. № 2. С. 55–60.  
DOI: 10.31040/2222-8349-2018-0-2-55-60.
- Bidabadi S.S., Jain S.M. Cellular, Molecular, and Physiological Aspects of In Vitro Plant Regeneration // Plants. 2020. V. 9.  
DOI: 10.3390/plants9060702.
- Cosic T., Raspor M. The Role of Auxin and Cytokinin Signaling Components in *de novo* Shoot Organogenesis // Aftab T. (ed.) Auxins, Cytokinins and Gibberellins Signaling in Plants. Signaling and Communication in Plants. Springer, Cham, 2022.  
DOI: 10.1007/978-3-031-05427-3\_3.
- Dong Y., Zhang W., Li J., Wang D., Bai H., Li H., Shi L. The transcription factor LaMYC4 from lavender regulates volatile terpenoid biosynthesis // BMC Plant Biol. 2022. V. 22. Iss. 289.  
DOI: 10.1186/s12870-022-03660-3.
- Effferth T. Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures // Engineering. 2019. V. 5. P. 50–59.  
DOI: 10.1016/j.eng.2018.11.006.
- Feher A. Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology? // Front. Plant Sci. 2019. V. 26.  
DOI: 10.3389/fpls.2019.00536.
- Feher A. A Common Molecular Signature Indicates the Pre-Meristematic State of Plant Calli // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. Iss. 17.  
DOI: 10.3390/ijms241713122.
- Fidler J., Graska J., Gietler M., Nykiel M., Prabucka B., Rybarczyk-Plonska A., Muszynska E., Morkunas I., Labudda M. PYR/PYL/RCAR Receptors Play a Vital Role in the Abscisic-Acid-Dependent Responses

- of Plants to External or Internal Stimuli // *Cells*. 2022. V. 11. Iss. 8.  
DOI: 10.3390/cells11081352.
- Hisano H., Matsuura T., Mori I.C., Yamane M., Sato K. Endogenous hormone levels affect the regeneration ability of callus derived from different organs in barley // *Plant Physiol. Biochem.* 2016. V. 99. P. 66-72.  
DOI: 10.1016/j.plaphy.2015.12.005.
- Ikeuchi M., Iwase A., Ito T., Tanaka H., Favero D.S., Kawamura A., Sakamoto S., Wakazaki M., Tameshige T., Fujii H., Hashimoto N., Suzuki T., Hotta K., Toyooka K., Mitsuda N., Sugimoto K. Wound-inducible WUSSEL-RELATED HOMEBOX 13 is required for callus growth and organ reconnection // *Plant Physiol.* 2022. V. 188. Iss. 1. P. 425–441.  
DOI: 10.1093/plphys/kiab510.
- Ikeuchi M., Iwase A., Rymen B., Lambolez A., Kojima M., Takebayashi Y., Heyman J., Watanabe S., Seo M., De Veylder L., Sakakibara H., Sugimoto K. Wounding Triggers Callus Formation via Dynamic Hormonal and Transcriptional Changes // *Plant Physiol.* 2017. V. 175. Iss. 3. P. 1158–1174.  
DOI: 10.1104/pp.17.01035.
- Ikeuchi M., Favero D.S., Sakamoto Y., Iwase A., Coleman D., Rymen B., Sugimoto K. Molecular Mechanisms of Plant Regeneration // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2019. V. 70. P. 377–406.  
DOI: 10.1146/annurev-arplant-050718-100434.
- Karami O., Philipsen C., Rahimi A., Nurillah A.R., Boutiller K., Offringa R. Endogenous auxin maintains embryonic cell identity and promotes somatic embryo development in *Arabidopsis* // *Plant J.* 2023. V. 113. Iss. 1. P. 7–22.  
DOI: 10.1111/tpj.16024.
- Kharel P., Creech M.R., Nguyen C.D., Vendrame W.A., Munoz P.P., Huo H. Effect of explant type, culture medium, and BAP concentration on *in vitro* shoot development in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivars // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2022. V. 58. P. 1057–1065.  
DOI: 10.1007/s11627-022-10299-0.
- Kruglova N.N., Titova G.E., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E. Cytophysiological features of the Cereal-based Experimental System “Embryo In Vivo – Callus In Vitro” // *Russ. J. Dev. Biol.* 2021. V. 52. № 4. P. 199–214.  
DOI: 10.1134/S1062360421040044.
- Kruglova N., Zinatullina A., Yegorova N. Histological Approach to the Study of Morphogenesis in Callus Cultures In Vitro: A review // *Int. J. Plant Biol.* 2023. V. 14. Iss. 2. P. 533–545.  
DOI: 10.3390/ijpb14020042.
- Kudoyarova G.R., Korobova A.V., Akhiyarova G.R., Arkhipova T.N., Zaytsev D.Yu., Prinsen E., Egutkin N.L., Medvedev S.S., Veselov S.Yu. Accumulation of cytokinins in roots and their export to the shoots of durum wheat plants treated with the protonophore carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) // *J. Exp. Bot.* 2014. V. 65. P. 2287–2294.  
DOI: 10.1093/jxb/eru113.
- Leelavathi D., Raajasubramanian D., Ramu L., Haseena R., Midhila P., GovindaRaju M.V., Lavanya G., Chetan H.C., Narendra K. *Lavandula angustifolia* L. plants regeneration from *in vitro* leaf explants-derived callus as conservation strategy // *Biotechn. Veg.* 2020. V. 20. № 2. P. 75–82.
- Lu H., Xu P., Hu K., Xiao Q., Wen J., Yi B., Ma C., Tu J., Fu T., Shen J. Transcriptome profiling reveals cytokinin promoted callus regeneration in *Brassica juncea* // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2020. V. 141. P. 191–206.  
DOI: 10.1007/s11240-020-01779-5.
- Mostafa H.H.A., Wang H., Song J., Li X. Effects of genotypes and explants on garlic callus production and endogenous hormones // *Sci Rep.* 2020. V. 10. Iss. 1.  
DOI: 10.1038/s41598-020-61564-4.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. P. 473–497.  
DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Ohbayashi I., Sakamoto Y., Kuwae H., Kasahara H., Sugiyama M. Enhancement of shoot regeneration by treatment with inhibitors of auxin biosynthesis and transport during callus induction in tissue culture of *Arabidopsis thaliana* // *Plant Biotechnol.* 2022. V. 39. Iss. 1. P. 43–50.  
DOI: 10.5511/plantbiotechnology.21.1225a.
- Ozyigit I.I., Dogan I., Hocaoglu-Ozyigit A., Yalcin B., Erdogan A., Yalcin I.E., Cabi E., Kaya Y. Production of secondary metabolites using tissue culture-based biotechnological applications // *Front. Plant Sci.* 2023. V. 14.  
DOI: 10.3389/fpls.2023.1132555.
- Raspor M., Motyka V., Kaleri A.R., Ninkovic S., Tubic L., Cingel A., Cosic T. Integrating the Roles for Cytokinin and Auxin in De Novo Shoot Organogenesis: From Hormone Uptake to Signaling Outputs // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. Iss. 16.  
DOI: 10.3390/ijms22168554.
- Salehi B., Mnayer D., Özçelik B., Altin G., Kasapoğlu K.N., Daskaya-Dikmen C., Sharifi-Rad M., Selamoglu Z., Acharya K., Sen S., Matthews K.R., Fokou P.V.T., Sharopov F., Setzer W.N., Martorell M., Sharifi-Rad J. Plants of the Genus *Lavandula*: From Farm to Pharmacy // *Nat. Prod. Comm.* 2018. V. 13. Iss. 10. P. 1385–1402.  
DOI: 10.1177/1934578X1801301037.
- Salinas-Patino V.A., Espinoza-Mellado M.R., Hernandez-Pimentel M.V., García-Pineda M., Montes-Villafan S., Rodríguez-Dorantes A. Phytohormones Action on *Fouquieria splendens* Callogenesis and Organogenesis Processes // *Int. J. Agricult. Innov. Res.* 2018. V. 7. Iss. 2. P. 2319–1473.
- 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 Indoleacetic and Abscisic Acids // *Russ. J. Dev. Biol.* 2019. V. 50. No 1. P. 124–135.  
DOI: 10.1134/S1062360419030056
- Skoog F., Miller C.O. Chemical Regulation of Growth and Organ Formation in Plant Tissues Cultured In Vitro // *Symp. Soc. Exp. Biol.* 1957. V. 11. P. 118–130.

- Smeringai J., Schruppfova P.P., Pernisova M.* Cytokinins – regulators of *de novo* shoot organogenesis // *Front. Plant Sci.* 2023. V. 14.  
DOI: 10.3389/fpls.2023.1239133.
- Spinoso-Castillo J.L., Bello-Bello J.J.* In Vitro Stress-Mediated Somatic Embryogenesis in Plants // *Meth. Mol. Biol.* 2022. V. 2527. P. 223–235.  
DOI: 10.1007/978-1-0716-2485-2\_16.
- Vysotskaya L.B., Korobova A.V., Kudoyarova G.R.* Abscisic acid accumulation in the roots of nutrient-limited plants: Its impact on the differential growth of roots and shoots // *J. Plant Physiol.* 2008. V. 165. P. 1274–1279.  
DOI: 10.1016/j.jplph.2007.08.014.
- Wang C., Ma H., Zhu W., Zhang J., Zhao X., Li X.* Seedling-derived leaf and root tip as alternative explants for callus induction and plant regeneration in maize // *Physiol. Plant.* 2021. V. 172. Iss. 3. P. 1570–1581.  
DOI: 10.1111/ppl.13347.
- Wojcik A.M., Wojcikowska B., Gaj M.D.* Current Perspectives on the Auxin-Mediated Genetic Network that Controls the Induction of Somatic Embryogenesis in Plants // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. Iss. 4.  
DOI: 10.3390/ijms21041333.
- Yegorova N., Kruglova N., Galin I., Stavtzeva I.* Induction of morphogenesis in the callus culture of *Lavandula angustifolia* Mill. // *BIO Web Conf.* 2020. V. 24.  
DOI: 10.1051/bioconf/20202400098

## The content of endogenous hormones in explants and calluses of *Lavandula angustifolia* Mill. at the initial stages of *in vitro* culture

N. N. Kruglova<sup>1, 2, #</sup>, I. R. Galin<sup>2</sup>, N. A. Yegorova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Agriculture of Crimea, Kievskaya str., 150, Simferopol, 295043 Russia

<sup>2</sup>Ufa Institute of biology – subdivision of the UFRS RAS, pr. Oktyabrya, 69, Ufa, 450054 Russia

#E-mail: kruglova@anrb.ru

The content of endogenous hormones (auxin IAA, cytokinines, ABA) in explants of various types (segments of leaf, bud, stem), primary calluses induced from them, as well as morphogenic and non-morphogenic calluses at the initial stages of *in vitro* culture by the immunoassay method was studied for the first time for *Lavandula angustifolia* Mill. The maximum value of hormone levels in such explants as segments of bud was shown. An increase in the content of hormones in primary calluses was revealed in comparison with similar characteristics in all types of explants. The higher level of the active form of cytokinin (trans-zeatin) and ABA, as well as the lower level of the inactive form of cytokinin (zeatin-nucleotide) and auxin IAA were identified in morphogenic callus compared with non-morphogenic callus. It is suggested that the content of endogenous hormones in explants and calluses of *L. angustifolia* is due to their histological status. The conclusion is made about the unified histophysiological mechanisms of callusogenesis and morphogenesis *in vitro* in the studied plant.

*Kew words:* callus *in vitro*, morphogenesis, auxin, cytokinin, abscisic acid, *Lavandula angustifolia* Mill.