

УДК 581.1;634.8;633.11

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОЙ АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОРАСТАЮЩИЕ СЕМЕНА ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР

**Арабова Л.И., кандидат биологических наук, тел.: +79250755749,
l.arabova@gmail.com**

**Чумикина Л.В., кандидат биологических наук;
Топунов А.Ф., доктор биологических наук, профессор
Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный
исследовательский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии наук**

Ключевые слова: абсцизовая кислота (АБК), прорастание, тритикале, пшеница, мобилизация белков.

Работа посвящена изучению действия экзогенной АБК на прорастание семян пшеницы и тритикале. Установлено, что ростовые процессы зависят от концентрации АБК и стадии набухания семян. АБК (10^{-6} – 10^{-4} М) задерживает прорастание, особенно на ранних этапах. Высокая концентрация АБК (10^{-4} М) препятствует мобилизации белковых отложений в зародыше пшеницы, что, вероятно, способствует ингибированию прорастания.

Введение. Прорастание семян является критическим этапом в жизненном цикле сельскохозяйственных культур и имеет решающее значение для успешного земледелия и продовольственной безопасности [1]. Эффективное прорастание требует активации множества физиологических и биохимических процессов, которые являются результатом сложных взаимодействий между внутренними факторами (генетическими, метаболическими, гормональными) и факторами окружающей среды (температура, влажность, свет и т.д.) [1]. Ключевая роль в координации развития растений принадлежит сигнальным молекулам – фитогормонам [2, 3]. К основным фитогормонам относятся: абсцизовая кислота (АБК), гиббереллины (ГК), ауксины, цитокинины, этилен и брассиностероиды. Особое внимание заслуживает АБК, которая играет важную роль в регуляции покоя и

прорастания семян, а также выступает в качестве сигнального гормона, контролирующего адаптацию растений к стрессовым условиям окружающей среды [3, 4]. Именно эта роль АБК, как "гормона стресса", открывает широкие возможности для ее применения в агрономии и агроэкологии.

В последние годы растет интерес к пониманию потенциальных преимуществ экзогенного применения АБК в сельском хозяйстве. Исследования показали, что обработка растений этим фитогормоном может повысить их засухоустойчивость, снизить негативное воздействие засоления и повысить устойчивость к низким и высоким температурам [5]. Однако, важно учитывать, что усиление устойчивости к стрессам под действием АБК может сопровождаться ингибированием роста, что может негативно влиять на урожайность и качество семян. Поэтому, необходим тонкий контроль и оптимизация применения АБК. Понимание механизмов действия экзогенной АБК может способствовать разработке стратегий для: 1) для предотвращения предуборочного прорастания, а также для индукции или усиления покоя семян в целях длительного хранения; 2) улучшения прорастания в неблагоприятных условиях.

Таким образом, целью данной работы является: 1) исследование действия экзогенной АБК на особенности прорастания семян тритикале (гибрида пшеницы и ржи) и пшеницы в зависимости от ее концентрации и стадии прорастания, а также 2) изучение влияния АБК на мобилизацию запасных белков, критически важную для успешного прорастания. Решение этих задач позволит приблизиться к разработке эффективных стратегий контроля покоя и улучшения прорастания, раскрывая потенциал АБК для практического применения в сельском хозяйстве.

Материалы и методы исследований. Исследования проводились на семенах двух зерновых культур: озимой пшеницы *Triticum aestivum* (сорт "Галина") и тритикале *Triticosecale* (сорт "Гермес"), предоставленные ФИЦ "Немчиновка". Воздушно-сухие семена дезинфицировали раствором KMnO_4 , промывали, отбирали по размеру и проращивали в стерильных чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной дистиллированной водой, в темноте при 22°C . Предварительно оценивали жизнеспособность семян как процент

проросших семян, который составил 90 % ($n=100$). Для анализов использовали целые зерна и изолированные зародыши.

Для определения фаз набухания строили график изменения сырого веса семян:

I (быстрое поглощение воды, 10-12 ч), II (лаг-период, 12-14 ч) и III (рост зародыша).

Обработка АБК: Семена обрабатывали растворами АБК (10^{-4} М, 10^{-5} М, 10^{-6} М, 10^{-8} М) в соответствии со следующими схемами: 1) Непрерывная обработка АБК (10^{-4} М, 10^{-5} М) от начала набухания до 9 суток; 2) Набухание в растворе АБК (10^{-5} М) в течение первых 6 ч; 3) Обработка АБК перед лаг-фазой: H_2O (0-6 ч) $\rightarrow$ АБК (10^{-5} М, 6-12 ч) $\rightarrow$ H_2O ; 4) Обработка АБК в период роста проростка (6 ч): H_2O (0-24 ч) $\rightarrow$ АБК (10^{-5} М, 24-30 ч) $\rightarrow$ H_2O ; 5) Обработка АБК в период набухания и лаг-фазы: АБК (10^{-4} М, 10^{-5} М, 10^{-6} М, 10^{-8} М, 0-24 ч) $\rightarrow$ H_2O ; 6) Обработка АБК в период роста проростка (24 ч): H_2O (0-24 ч) $\rightarrow$ АБК (10^{-4} М, 10^{-5} М, 10^{-6} М, 10^{-8} М, 24-48 ч) $\rightarrow$ H_2O . Выбор концентраций основан на литературных данных [6, 7]. Контрольные семена проращивали в воде.

Оценка прорастания: после обработки АБК семена промывали и проращивали затем на свету. Процент прорастания определяли подсчетом проросших семян.

Определение содержания АБК: Содержание АБК в зародышах определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на жидкостном хроматографе Аквилон Стайер со спектрофотометрическим детектором UVV 104, используя внешний стандарт (реактивы фирмы “Aldrich” (Германия)). Образцы для ВЭЖХ готовили по методике, описанной в нашей работе [8].

Анализ полипептидного состава: Полипептидный состав зародышей анализировали методом одномерного ДС-Na-гель-электрофореза [9], используя гелевые пластины с градиентом концентрации акриламида 10 - 20 % в разделяющем геле (pH 8,8) и 6%-ного акриламида в концентрирующем геле (pH 6,8), с последующим окрашиванием Кумасси R-250. В качестве маркерных белков использовали наборы белков фирм “Pharmacia” (Швеция) и “Serva” (Германия).

Статистическая обработка: Данные представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение ($n=3$). Статистический анализ проводили в Microsoft Office Excel.

Результаты исследований и их обсуждение.

Влияние экзогенной АБК на ростовые процессы. Ранее нами было показано, что низкое содержание эндогенной АБК необходимо для успешного прорастания семян пшеницы и тритикале [8]. Исследование влияния экзогенной АБК (10^{-5} М) на изменение сырого веса семян тритикале не выявило существенных различий в зависимости от стадии обработки (0-6 ч, 6-12 ч, 24-30 ч) (рис. 1).

Однако, экзогенная АБК оказывала ингибирующее действие на физиологические процессы, связанные с прорастанием. При обработке АБК на стадиях физического набухания (0-6 ч) и роста проростка (24-30 ч) наблюдалась задержка роста проростка, в то время как обработка на стадии, предшествующей лаг-фазе (6-12 ч), оказывала менее выраженный эффект. Это указывает на разную чувствительность стадий набухания семян к экзогенной АБК.

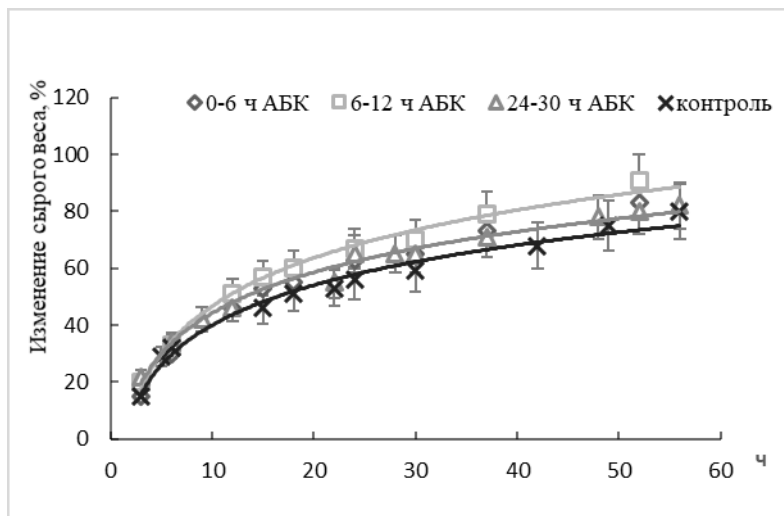


Рисунок 1 - Изменение сырого веса семян тритикале (%) при набухании с экзогенной АБК (10^{-5} М) в течение 6 ч на разных стадиях прорастания

Изменение содержания эндогенной АБК в ответ на экзогенную АБК в семенах тритикале. В предыдущей нашей работе было показано, что кратковременный тепловой стресс увеличивает содержание эндогенной АБК в зародышах семян тритикале и пшеницы [8]. В данном исследовании установлено, что добавление экзогенной АБК (10^{-5} М) приводит к увеличению содержания эндогенной АБК в набухающих семенах тритикале. Обработка в течение первых 6 ч (0-6 ч) увеличивала содержание эндогенной АБК на 0.5 нг/г, а обработка на этапе (6-12 ч) - на 2.3 нг/г по сравнению с контролем. Это позволяет предположить, что экзогенная АБК стимулирует не только поглощение, но и биосинтез АБК в зародыше. Следовательно, увеличение содержания эндогенной АБК, вызванное экзогенным воздействием, может влиять на скорость прорастания и устойчивость к стрессам на ранних этапах развития семян.

Влияние концентрации экзогенной АБК на ростовые процессы семян пшеницы. Исследование показало, что экзогенная АБК оказывает концентрационно-зависимый ингибирующий эффект на ростовые процессы пшеницы. В то время как на начальном этапе набухания (до 24 часов) АБК (10^{-4} – 10^{-8} М) не влияла на изменение сырого веса семян, то после проклевывания (в 48 и 72 ч) наблюдалось четкое ингибирование роста, пропорциональное концентрации АБК (рис. 2).

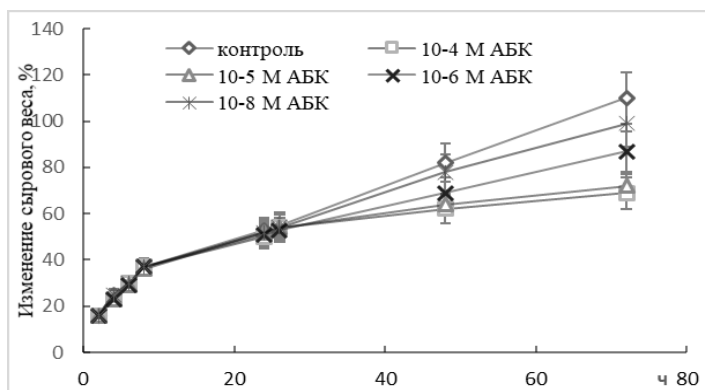


Рисунок 2 - Изменение сырого веса семян пшеницы (%) при набухании с экзогенной АБК разной концентрации в течение первых 24 ч набухания

Длительное набухание (до 9 суток) в присутствии АБК (10^{-5} М) значительно уменьшало длину стебля и корешков, а 10^{-4} М АБК полностью подавляла прорастание. Полученные результаты согласуются с литературными данными об ингибирующем действии АБК [6, 7]. Однако, в отличие от исследований на семенах риса [6], стимулирующего эффекта при низкой концентрации АБК (10^{-8} М) не наблюдалось. Вероятно, наблюдаемые противоречия в эффектах на разные виды растений можно объяснить различиями в тканевой чувствительности к АБК.

Физиолого-биохимические характеристики ответа прорастающих семян на экзогенную АБК. Первые часы набухания семян связаны с физическим поглощением воды. Нами установлено, что экзогенная АБК (5×10^{-7} М) замедляла поглощение воды изолированными зародышами пшеницы в течение первых 4 часов набухания, снижая их вес в 2,5 раза по сравнению с контролем. Это указывает на чувствительность начального этапа набухания к АБК, что согласуется с данными других исследователей об ингибировании АБК поглощения воды, которое связывают с предотвращением ослабления клеточной стенки [10, 11].

Прорастание семян происходит в два этапа: до и после появления корешка. Сначала вода запускает процессы подготовки к прорастанию, используя запасы, содержащиеся в сухом семени. Однако, успешное завершение этого этапа еще не гарантирует дальнейшее развитие. Дальнейшее развитие и появление корешка зависит от многих факторов. Известно, что АБК может помешать этому, замедляя рост клеток корешка [10]. Поэтому мы решили исследовать, как разные концентрации АБК влияют на эти два этапа прорастания – до и после появления корешка. Обработка АБК до проклевывания (0-24 часа) ингибировала прорастание, снижая процент проросших семян (рис. 3).

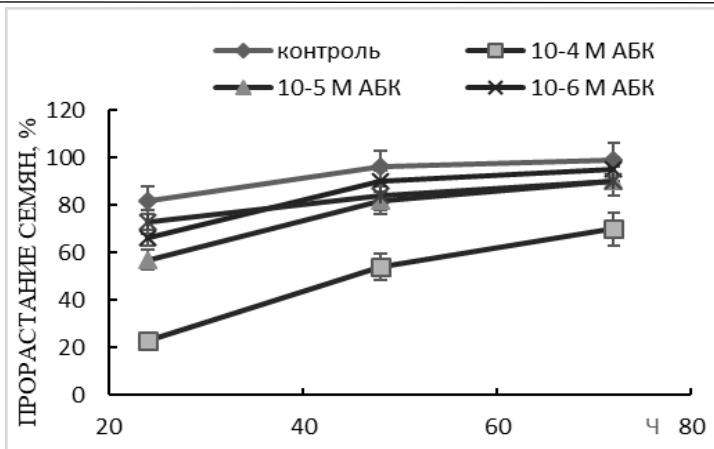


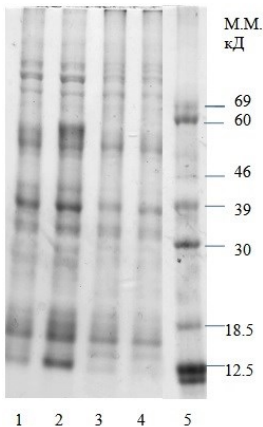
Рисунок 3 - Прорастание семян пшеницы (%) при набухании с экзогенной АБК разной концентрации в течение первых 24 ч набухания

После переноса на воду проростки восстанавливали рост (кроме варианта с 10^{-4} М АБК). Мы предположили, что экзогенная АБК ингибирует процесс растяжения клеток, что и приводит к торможению проклевывания. Обработка АБК после проклевывания (24-48 ч) оказывала более выраженный ингибирующий эффект, особенно при концентрации 10^{-5} М, что указывает на более высокую чувствительность стадии роста проростка к АБК. Эти результаты частично противоречат данным для фасоли [10], что, вероятно, связано с тканеспецифичностью ответа на АБК у зерновых и двудольных растений. Высокая концентрация АБК (10^{-4} М) значительно задерживала рост проростка на обеих стадиях, что согласуется с литературными данными [10, 12, 13]. Ингибирование прорастания экзогенной АБК оказалось похожим на эффект длительного теплового стресса на прорастание, который мы наблюдали ранее [14], что позволяет рассматривать АБК в повышенной концентрации как стрессовый фактор.

В наших ранних исследованиях гороха и зерновых культур [14, 15] мы установили, что для начала роста зародыша необходимо расщепление запасных белков. Мы также показали, что тепловой стресс

нарушает этот процесс, приводя к замедлению или остановке метаболизма и синтезу белков теплового шока (БТШ) [9]. Длительное воздействие высокой температуры (40°C) приводило к полной остановке прорастания из-за потери клетками зародыша способности к нормальному метаболизму, необходимого для инициации прорастания. Важно, что при этом состав белков не менялся. Это позволило нам предположить, что ингибирование прорастания при высокой температуре связано с невозможностью расщепления собственных белков зародыша [14, 15]. В связи с этим, мы решили изучить, как экзогенная АБК, подобно тепловому стрессу, влияет на расщепление белковых запасов в зародышах. ДСNa-ПААГ-электрофорез показал, что АБК в концентрации 10^{-5} М (незначительное ингибирование) не блокирует мобилизацию белков. Однако, при 10^{-4} М (полное ингибирование), полипептидный состав зародыша оставался сходным с составом сухих семян (0 ч), что указывает на препятствие мобилизации белковых отложений (рис. 4).

Это говорит о том, что высокая концентрация АБК (10^{-4} М) препятствует мобилизации белков в зародыше пшеницы, что, вероятно, является причиной блокировки прорастания за счет ингибирования протеолитических ферментов, либо нарушения их транспорта или подавлением синтеза этих ферментов. Это согласуется с данными для *Arabidopsis* [12], где АБК предотвращала деградацию запасных белков.



1 – контроль 0 ч; 2 – 10^{-4} М АБК 24 ч; 3 –
 10^{-5} М АБК 24 ч;
 4 – контроль 24 ч; 5 – метчики

Рисунок 4 - Распределение полипептидов суммарного клеточного белка зародышей семян пшеницы в ПААГе ДС-Na-диск-электрофореза в процессе набухания с экзогенной АБК

Полученные результаты свидетельствуют о том, что экзогенная АБК, в зависимости от концентрации и стадии прорастания семян злаков, оказывает влияние на физиолого-биохимические процессы, начиная с периода поглощения воды и заканчивая ростом проростка.

Заключение. Проведенные исследования подтверждают регулирующее влияние экзогенной АБК на процессы прорастания злаковых культур. Экзогенная АБК, в отличие от эндогенной, преимущественно ингибирует прорастание семян, находящихся в состоянии вынужденного покоя, что следует учитывать при ее применении в сельском хозяйстве.

Наше исследование подтверждает важность мобилизации запасных веществ для успешного прорастания и указывает на потенциальную возможность регуляции этого процесса экзогенной АБК. В целом, наши данные расширяют понимание механизмов действия экзогенной АБК на прорастание злаков, открывая возможности для ее использования в агрономии и агроэкологии. Экзогенная обработка АБК может стать инструментом для улучшения прорастания и повышения стрессоустойчивости, а также для предотвращения предуборочного прорастания зерна, что может снизить экономические потери. Однако, для эффективного управления этими процессами в сельскохозяйственной практике необходимы дальнейшие углубленные исследования молекулярных и физиолого-биохимических механизмов действия экзогенной АБК, учитывающие видовую и сортовую специфичность культур, а также факторы окружающей среды, что позволит разработать практические рекомендации по ее применению в различных агроэкологических условиях.

Библиографический список:

1. Bewley, J.D. Seeds: Physiology of development, germination and dormancy / J.D. Bewley, K. Bradford, H. Hilhorst, H. Nonogaki Springer, 2013. 3rd edition. 392 p.
2. Verma, V. Plant hormone-mediated regulation of stress responses / V. Verma, P. Ravindran, P.P. Kumar // BMC Plant Biol. - 2016. - V. 16. - №1. - Art. 86.

3. Чумикина, Л.В. Фитогормоны и абиотические стрессы (Обзор) / Л.В. Чумикина, Л.И. Арабова, В.В. Колпакова, А.Ф. Топунов // Химия растительного сырья. - 2021. - № 4. - С. 5-30.
4. Singh, A. Absciscic acid in plants under abiotic stress: crosstalk with major phytohormones / A. Singh, A. Roychoudhury // Plant Cell Rep. - 2023. - V. 42. - № 6. - P. 961-974.
5. Sah, S.K. Absciscic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants / S.K. Sah, K.R. Reddy, J. Li // Front. Plant Sci. Sec. Plant Biotechnology. - 2016. - V. 7.
6. Humplík, J.F. To Stimulate or inhibit? That is the question for the function of absciscic acid / J.F. Humplík, V. Bergougnoux, E.V. Volkenburgh // Trends Plant Sci. - 2017. - V. 22. - № 10. - P. 830-841.
7. Latif, H.H. Physiological responses of *Pisum sativum* plant to exogenous ABA application under drought conditions / H.H. Latif // Pak. J. Bot. - 2014. - V. 46. - № 3. - P. 973-982.
8. Чумикина, Л.В. Роль фитогормонов в регуляции устойчивости семян пшеницы, ржи и тритикале к действию повышенных температур при прорастании / Л.В. Чумикина, Л.И. Арабова, В.В. Колпакова, А.Ф. Топунов // Прикладная биохимия и микробиология. - 2019. - Т. 55. - № 1. - С. 77-85.
9. Гумилевская, Н.А. Действие повышенных температур на синтез белка в осях набухающих зародышей гороха / Н.А. Гумилевская, Л.В. Чумикина, Л.И. Арабова, М.В. Зимин, В.Р. Шатилов // Физиология растений. - 1996. - Т. 43. - № 2. - С. 247-255.
10. Мартын, Г.И. Влияние абсцизовой кислоты на прорастание семян фасоли / Г.И. Мартын, В.А. Берестецкий, Л.И. Мусатенко, К.М. Сытник // Физиология и биохимия культ. растений. - 1991. - Т. 23. - № 6. - С. 546-551.
11. Schopfer, P. Control of seed germination by absciscic acid: II. Effect on embryo water uptake in *Brassica napus* L. / P. Schopfer, C. Plachy // Plant Physiol. - 1984. - V. 76. - № 1. - P. 155-160.
12. Garcarrubio, A. Absciscic acid inhibits germination of mature *Arabidopsis* seeds by limiting the availability of energy and nutrients / A. Garcarrubio, J. Legaria, A. Covarrubias // Planta. - 1997. - V. 203. - P. 182-187.

13. Badowiec, A. Influence of exogenous abscisic acid on alterations in protein expression in the proteome of *Triticosecale* seedlings / A. Badowiec, S. Świgońska, E. Szypulska, S. Weidner // Acta Physiol. Plant. - 2012. - V. 34. - № 6. - P. 2359-2368.

14. Гумилевская, Н.А. Действие длительного теплового стресса на семена гороха *Pisum sativum* L. в период прорастания / Н.А. Гумилевская, Л.И. Арабова, Л.В. Чумикина, В.Р. Шатилов // Физиология растений. - 1997. - Т. 44. - № 5. - С. 690-698.

15. Арабова, Л.И. Действие теплового шока на прорастание и мобилизацию запасных белков зерна тритикале, ржи и пшеницы / Л.И. Арабова, Л.В. Чумикина, А.Ф. Топунов // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. - 2011. - №2. - Ч. 1. - С. 81-87.

EFFECT OF EXOGENOUS ABSCISIC ACID ON GERMINATING SEEDS OF GRAIN CROPS

Arabova L.I., Chumikina L.V., Topunov A.F.

Keywords: *abscisic acid (ABA), germination, triticales, wheat, protein mobilization.*

Exogenous abscisic acid (ABA) inhibited wheat and triticales seed germination, dependent on concentration and imbibition stage. ABA concentrations (10^{-6} - 10^{-4} M) suppressed germination, particularly early on. The inhibitory effect of ABA (10^{-4} M) correlated with impaired protein reserve mobilization in wheat embryos.