ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotex-journal.ru>

ВЛИЯНИЕ АБК НА СОЗРЕВАНИЕ ЗАРОДЫШЕЙ ЯЧМЕНЯ *IN VIVO*: РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ ДЕФИЦИТНОГО ПО АБК МУТАНТА

Сельдимирова О.А., Галин И.Р.,
Кудоярова Г.Р., Круглова Н.Н., Веселов Д.С.

Уфимский институт биологии Уфимского
федерального исследовательского центра РАН, Уфа
E-mail: o_seldimirova@mail.ru

В результате анализа данных исследования иммунолокализации АБК, ИУК и аквапоринов HvPIP2;2 и HvPIP2;5 в зрелых зародышах ячменя АБК-дефицитного мутанта AZ34 и его исходной формы – сорта Steptoe установлены сходство и различия в распределении изученных гормонов и белков. Наиболее интенсивное окрашивание как на АБК, так и на ИУК отмечено в coleorhize и корне в зародышах обоих генотипов. Выявлен достоверно более высокий уровень содержания АБК в клетках coleorhизы, корней и coleoptиля зародышей Steptoe по сравнению с AZ34 и достоверно более высокий уровень содержания ауксинов в корневой меристеме зародышей AZ34 по сравнению со Steptoe. Детекция аквапоринов HvPIP2;2 и HvPIP2;5 выявила характерное окрашивание периферии клеток зародышей Steptoe и необычное для PIP аквапоринов окрашивание цитоплазмы клеток зародышей AZ34. Выявленные особенности в уровне и распределении гормонов и аквапоринов могут обуславливать различия между растениями этих генотипов по способности семян к поддержанию состояния покоя. В целом, полученные данные подтверждают определяющую роль АБК в созревании зародышей и переходе семян к покою.

Ключевые слова: ячмень, *Hordeum vulgare* L., зародыш, созревание, АБК, ИУК, аквапорины

INFLUENCE OF ABA ON THE MATURATION OF BARLEY EMBRYOS *IN VIVO*: RESULTS OF STUDYING OF ABA-DEFICIENT MUTANT

Seldimirova O.A., Galin I.R.,
Kudoyarova G.R., Kruglova N.N., Veselov D.S.

Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research
Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa
E-mail: o_seldimirova@mail.ru

As a result of the analysis of the data on the immunolocalization of ABA, IAA and aquaporins HvPIP2;2 and HvPIP2;5 in the mature barley embryos of ABA-deficient mutant AZ34 and its original form cv. Steptoe, similarities and differences in the distribution of the studied hormones and proteins were established. The most intense staining in both ABA and IAA is observed in the coleorhiza and root in the embryos of both genotypes. A significantly higher level of ABA was detected in the cells of coleorhiza, roots and coleoptile of Steptoe embryos compared to AZ34 and a significantly higher level of auxins in the root meristem of AZ34 embryos compared to Steptoe. The detection of aquaporins HvPIP2;2 and HvPIP2;5 revealed characteristic staining of the periphery of Steptoe embryo cells and unusual for PIP aquaporins staining of the cytoplasm of AZ34 embryo cells. The revealed features in the level and distribution of hormones and aquaporins can determine the differences between the plants of these genotypes in the ability of seeds to maintain dormancy. In general, the obtained data confirm the decisive role of ABA in the embryo maturation and the transition of seeds to dormancy.

Keywords: barley (*Hordeum vulgare* L.), embryo, maturation, ABA, IAA, aquaporins

Поступила в редакцию: 10.12.2018

DOI: [10.31163/2618-964X-2018-1-4-177-185](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2018-1-4-177-185)

ВВЕДЕНИЕ

Абсцизовая кислота играет важную роль в регуляции созревания семян и их перехода к покою. Ее значение ярко проявляется, например, в преждевременном (еще до сбора урожая) прорастании семян дефицитных по АБК растений риса [Fang, Chu, 2008]. Максимум содержания этого гормона совпадает с поздними фазами развития семян [Nambara et al.,

2010], когда происходит резкое снижение их влажности. При этом АБК запускает синтез дегидринов, поддерживающих нативную структуру биополимеров созревающих семян при дегидратации [Аллагулова и др., 2003]. Вместе с тем, один из аспектов созревания семян, в реализацию которого может быть вовлечена АБК, заключается в возможной роли водных каналов аквапоринов в регуляции оттока воды из тканей созревающих семян на поздних стадиях их развития. Хотя участие аквапоринов в прорастании семян и обсуждается [Обручева и др., 2017], внимания их возможной роли в созревании семян практически не уделяется. Предположение о возможном участии АБК в регуляции активности водных каналов при созревании семян базируется на сведениях о способности этого гормона влиять на экспрессию генов, кодирующих эти белки, и уровне их содержания в клеточных мембранах [Chaumont, Tuerman, 2014]. Дефицитные по АБК мутанты являются удобным объектом для выявления значения этого гормона в регуляции процессов, связанных с созреванием семян. Роль АБК в регуляции созревания семян может также заключаться в ее влиянии на уровень других гормонов. Ранее нами было показано, что снижение уровня ауксинов в созревающих зерновках дефицитного по АБК мутанта задерживалось, что соответствовало более низкому уровню АБК по сравнению с растениями исходного генотипа [Сельдиминова и др., 2018]. Исследования динамики гормонов в развивающихся семенах проводили в основном на уровне целых органов или их частей [Nambara et al., 2010]. Использование же иммуногистохимического подхода позволяет сравнить содержание гормонов и аквапоринов в отдельных тканях зародыша.

В связи с этим цель данной работы состояла в выявлении роли АБК в регуляции уровня аквапоринов и ауксинов при созревании семян путем сравнительного иммуногистохимического выявления АБК, ИУК и HvPIP2 аквапоринов в зрелых зародышах дефицитного по АБК мутанта ячменя AZ34 и его исходного сорта Steptoe.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили АБК-дефицитный мутант ячменя AZ34 и его исходный сорт Steptoe. Для экспериментов использовали донорные растения, выращенные в полевых условиях научного стационара Уфимского Института биологии УФИЦ РАН (Уфимский район, сезон 2018 г.).

Стадию развития зародышей оценивали визуально при помощи стереомикроскопа Technival 2 (Carl Zeiss, Germany): с использованием периодизации [Круглова, 2012] установлено, что стадии зрелого зародыша ячменя соответствуют 28-30 сут после опыления.

Фиксацию растительного материала для иммуногистохимического анализа проводили в 4 %-ном растворе карбодиимида (Sigma, Япония), приготовленном на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.3) в течение 4 час под вакуумом. Для последующей постфиксации тканей зародыши помещали в смесь 4 %-ного параформальдегида (Riedel-de-Haën, Германия) и 0.1 %-ного глютаральдегида (Sigma, Германия) на 0.1 М фосфатном буфере и оставляли на ночь в холодильной камере. Далее образцы отмывали в 0.1 М фосфатном буфере (pH=7.3), обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации и заключали в гидрофильную метакрилатную смолу JB4 (Electron Microscopy Sciences, США). Полутонкие срезы (3 мкм) готовили при помощи микротомы HM 325 (Micom, Германия). Для иммуногистохимического анализа использовали специфические антитела, которые успешно

использовали ранее для иммунолокализации ИУК [Высоцкая и др., 2007; Seldimirova et al., 2016], АБК [Sharipova et al., 2016; Сельдимирова и др., 2017; Veselov et al., 2018] и аквапоринов [Sharipova et al., 2016]. Поликлональные антитела против аквапоринов плазмалеммы HvPIP2s были получены при иммунизации кроликов олигопептидами, соответствующими N-области HvPIP2;2 [Horie et al., 2011] и HvPIP2;5 [Sharipova et al., 2016]. Для выявления гормонов и аквапоринов на срезы наносили иммунную сыворотку в разведении 1:50 для ИУК, 1:80 для АБК и 1:50 для аквапоринов. Разведения антител готовили на ФоЖТ (0.1 М фосфатный буфер, содержащий 0.2 % желатина и 0.05 % Tween 20). Для оценки специфичности окрашивания часть срезов обрабатывались неиммунной сывороткой, не содержащей антитела к исследуемым гормонам и аквапоринам. Затем срезы после трехкратной промывки в 0.1 М фосфатном буфере, содержащем 0.05 % Tween 20 (ФоТ), обрабатывали мечеными коллоидным золотом вторыми антителами в разведении 1:40 (Aurion, USA) и инкубировали во влажной камере 1 час. После промывки в ФоТ срезы обрабатывали препаратом серебряного усилителя (Aurion, USA) для детекции гормонов и аквапоринов. Препараты просматривали и документировали с использованием микроскопа проходящего света Axio Imager (Carl Zeiss, Jena, Германия), оснащенного цифровой камерой AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Jena, Германия).

Интенсивность иммуноокрашивания на гормоны и аквапорины оценивали по 8-битным изображениям в оттенках серого с использованием программного обеспечения ImageJ (v.1_48, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), как описано в работе [Sharipova et al., 2016]. Для этого в интересующих участках срезов определялись средние значения интенсивности окрашивания пикселей по шкале в 255 значений от белого (0) до самого черного (255). Для каждого исследуемого параметра/генотипа анализировали, как минимум, 20 разных срезов. Интенсивность окрашивания выражали в условных единицах, при этом максимальное окрашивание принималось за 100, минимальное – за 0.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением программы Microsoft Office Excel 2010. В таблицах представлены средние арифметические значения и ошибки средних. Достоверность различий определяли с помощью t-теста.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнение окрашивание тканей зародыша на АБК выявило как сходство, так и различие генотипов ячменя по уровню этого гормона и его распределению между органами зародыша (рис. 1, 2).

Установлено, что как у AZ34, так и у Steptoe наиболее интенсивно окрашиваются coleoptila и корень. Однако у AZ34 интенсивность окрашивания разных участков корня одинакова (рис. 1б), в то время как в корне Steptoe сильнее окрашиваются кора корня и корневой чехлик, а клетки центрального цилиндра окрашиваются слабее (рис. 2а, в).

Как у AZ34, так и у Steptoe верхняя часть зародыша (апекс побега, листья, coleoptila и верхняя часть щитка) окрашивается слабее, чем корни, и, судя по интенсивности окраски, АБК равномерно распределена между клетками побега (рис. 1а, 2б). Однако визуально верхняя часть зародыша Steptoe окрашивается сильнее, чем у AZ34.

Рис. 1. Иммунолокализация АБК в зародышах ячменя АБК-дефицитного мутанта AZ34: (а) – верхняя часть зародыша, (б) – нижняя часть зародыша. Условные обозначения: АП – апекс побега, Л – лист, КЛ – coleoptиль, Крз – coleориза, Крн – корень, Щ – щиток. Масштаб: 200 мкм.

Рис. 2. Иммунолокализация АБК в зародышах ячменя сорта Steptoe: (а) – общий вид зародыша, (б) – верхняя часть зародыша, (в) – нижняя часть зародыша. Условные обозначения: АП – апекс побега, Л – лист, КЛ – coleoptиль, КК – кора корня, Крз – coleориза, КЧ – корневой чехлик, ЦЦ – центральный цилиндр корня. Масштаб: (а) – 200 мкм, (б, в) – 100 мкм.

Полуколичественный анализ интенсивности окрашивания с помощью программы ImageJ подтвердил достоверно более высокий уровень содержания АБК в клетках coleоризы, корней и coleоптиля Steptoe по сравнению с AZ34 (рис. 3). Различия между генотипами наиболее ярко проявились по содержанию гормона в coleоризе.

Рис. 3. Интенсивность окрашивания на АБК разных органов зародышей ячменя АБК-дефицитного мутанта AZ34 и его исходной формы Steptoe

Иммуногистохимическая детекция ауксинов с помощью специфических антител к ИУК выявила относительно невысокий и равномерный уровень их окрашивания в большинстве органов зародышей как у AZ34, так и у Steptoe. Исключение составил центральный цилиндр корня, клетки которого у обоих генотипов окрашивались слабее по сравнению с корой (рис. 4).

Рис. 4. Иммунолокализация ИУК в колеоризе и корнях зародышей АБК-дефицитного мутанта AZ34 (а) и его исходной формы Steptoe (б).

Условные обозначения: КК – кора корня, КМ – корневая меристема, Крз – колеориза, КЧ – корневой чехлик, ЦЦ – центральный цилиндр корня. Масштаб: 200 мкм.

Полуколичественная оценка интенсивности окрашивания показала достоверно более высокий уровень содержания ауксинов в корневой меристеме AZ34 по сравнению со Steptoe (рис. 5).

Рис. 5. Интенсивность окрашивания на ИУК разных органов зародышей ячменя АБК-дефицитного мутанта AZ34 и его исходной формы Steptoe

Детекция водных каналов с помощью специфических антител к HvPIP2;2 аквапоринам плазмаллемы выявила необычное для РІР аквапоринов окрашивание цитоплазмы у зародышей AZ34 (рис. 6а, б) и характерное окрашивание периферии клеток у зародышей Steptoe (рис. 6в).

Рис. 6. Иммунолокализация аквапоринов HvPIP2;2 в зародышах АБК-дефицитного мутанта AZ34 (а, б) и его исходной формы Steptoe (в).

Условные обозначения: КМ – корневая меристема, Крз – колеориза, Крн – корень, КЧ – корневой чехлик. Масштаб: (а, в) – 200 мкм, (б) – 50 мкм.

Такая же картина наблюдалась и при детекции водных каналов с помощью специфических антител к HvPIP2;5 аквапоринам плазмаллемы (данные не приведены).

Установлено также сходство в паттернах распределения АБК, ИУК и аквапоринов в разных органах зародышей ячменя обоих изучаемых генотипов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было установлено, что, в отличие от АБК-дефицитного мутанта ячменя AZ34, у которого все семена способны к прорастанию сразу же после сбора урожая, около половины семян ячменя сорта Steptoe не могли прорасти даже через 4 мес после сбора урожая [Ахиярова и др., 2017a]. Эти результаты легко объяснить способностью АБК подавлять прорастание семян, что было в меньшей степени выражено у дефицитного по АБК мутанта AZ34.

Полученные нами результаты иммуногистохимического анализа подтвердили более низкий уровень АБК в зрелых зародышах AZ34 по сравнению с растениями Steptoe, особенно заметно проявлявшийся в колеоризе зрелых зародышей (рис. 3). В работе [Barrero et al., 2009] показано, что именно уровень АБК в колеоризе важен для регуляции прорастания семян. Необходимость АБК для предотвращения преждевременного прорастания семян проявлялась в том, что в зрелых семенах AZ34 выявлен разрыв колеоризы кончиков зародышевого корня, указывающий на их готовность к преждевременному прорастанию, как это показано нами ранее [Сельдимирова и др., 2018]. Нами же иммуногистохимическими исследованиями установлено, что АБК начинает откладываться в клетках зародыша пшеницы на поздних стадиях развития, к концу формирования органов, при этом окрашивание на АБК отмечается во всех клетках зародыша, но наиболее интенсивно – в клетках колеоризы [Сельдимирова и др., 2017]. Максимальное значение содержания АБК в позднем эмбриогенезе при переходе зерновки пшеницы в стадию покоя выявлено и в работе [Suzuki et al., 2000].

Готовность корней к преждевременному прорастанию может быть связана с присутствием в семенах остаточной влаги из-за недостаточно эффективной работы водных каналов. У дефицитного по АБК мутанта мы обнаружили нарушение в нормальном распределении аквапоринов, которые вместо обычного расположения в плазмалемме [Обручева, Синькевич, 2010] локализовались в цитоплазме (рис. 6). Транспорт аквапоринов из цитоплазмы в плазмалемму является важным компонентом регуляции их активности [Chaumont, Tyerman, 2014], а способность АБК влиять на работу водных каналов хорошо известна [Chaumont, Tyerman, 2014]. Полученные нами результаты, свидетельствующие о нарушении нормального распределения аквапоринов у дефицитного по АБК мутанта, указывают на необходимость поддержания определенного уровня и распределения АБК в зародыше для регуляции транспорта аквапоринов из цитоплазмы в плазмалемму.

Для дефицитного по АБК мутанта было также характерно повышенное содержание ауксинов в меристеме зародышевого корня по сравнению со Steptoe (рис. 4). Ранее нами была обнаружена обратная зависимость между уровнем АБК и ауксинов в главном корне проростков ячменя [Ахиярова и др., 2017b], что могло быть связано со способностью АБК стимулировать конъюгацию свободных форм ауксинов [Du et al., 2012]. В данном случае также можно предполагать, что повышенный уровень ауксинов в меристеме корней мог быть прямым следствием пониженного уровня АБК у растений мутанта. Не исключено, что

именно повышенный уровень ауксинов мог способствовать преждевременному прорастанию корней у AZ34.

Таким образом, сравнительный иммуногистохимический анализ уровня и распределения ауксинов, АБК и аквапоринов HvPIP2 в зрелых зародышах дефицитного по АБК мутанта ячменя и растений его исходного сорта выявил особенности в уровне и распределении изученных гормонов и белков. Выявленными особенностями можно объяснить различия между растениями этих генотипов по способности семян к поддержанию состояния покоя. Полученные данные подтверждают определяющую роль АБК в созревании зародышей и переходе семян к покою.

В работе использована приборная база Центра коллективного пользования “Агидель” УФИЦ РАН.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-04-01477).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аллагулова Ч.Р., Гималов Ф.Р., Шакирова Ф.М., Вахитов В.А. Дегидрины растений: их структура и предполагаемые функции // Биохимия. 2003. Т. 68. № 9. С. 1157–1165.
2. Ахиярова Г.Р., Шарипова Г.В., Веселов С.Ю., Веселов Д.С. Содержание гормонов в клетках зародыша и влияние перекиси водорода и абсцизовой кислоты на прорастание зерновок пшеницы и ячменя // Материалы II международного симпозиума «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» и международной научной школы «Роль активных форм кислорода в жизни растений» / ред. И.В. Максимов и др. Уфа: ООО «Первая типография», 2017а. С. 56–59.
3. Ахиярова Г.Р., Шарипова Г.В., Высоцкая Л.Б., Иванов И.И., Веселов С.Ю., Веселов Д.С. Аквапорины в примордиях боковых корней дефицитного по АБК мутанта ячменя и его исходного сорта // Известия Уфимского НЦ РАН. 2017б. № 3 (1). С. 13–16.
4. Высоцкая Л.Б., Веселов С.Ю., Веселов Д.С., Филиппенко В.Н., Иванов Е.А., Иванов И.И., Кудоярова Г.Р. Иммуногистохимическая локализация и количественное определение ИУК при исследованиях регуляции роста корней // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 6. С. 926–931.
5. Круглова Н.Н. Периодизация эмбриогенеза пшеницы как методологический аспект биотехнологических разработок // Известия Уфимского НЦ РАН. 2012. № 2. С. 21–24.
6. Обручева Н.В., Синькевич И.А. Аквапорины и рост клеток // Физиология растений. 2010. Т. 57. № 2. С. 163–176.
7. Обручева Н.В., Синькевич И.А., Литягина С.В., Новикова Г.В. Особенности водного режима при прорастании семян // Физиология растений. 2017. Т. 64. № 4. С. 311–320. DOI: [10.7868/S0015330317030137](https://doi.org/10.7868/S0015330317030137)
8. Сельдиминова О.А., Галин И.Р., Круглова Н.Н., Веселов Д.С. Распределение ИУК и АБК в развивающихся зародышах пшеницы *in vivo* // Известия Уфимского НЦ РАН. 2017. № 3(1). С. 114–118.
9. Сельдиминова О.А., Круглова Н.Н., Галин И.Р., Веселов Д.С. Сравнительная оценка уровня ИУК, АБК и цитокининов в эмбриогенезе *in vivo* ячменя сорта Steptoe и его АБК-дефицитного мутанта AZ34 // Экобиотех. 2018. Том 1. № 3. С. 134–142. DOI: [10.3163/2618-964X-2018-1-3-134-142](https://doi.org/10.3163/2618-964X-2018-1-3-134-142)

10. Barrero J.M., Talbot M.J., White R.G., Jacobsen J.V., Frank Gubler F. Anatomical and transcriptomic studies of the coleorhiza reveal the importance of this tissue in regulating dormancy in barley // *Plant Physiol.* 2009. V. 150. № 2. P. 1006–1021. DOI: [10.1104/pp.109.137901](https://doi.org/10.1104/pp.109.137901)
11. Chaumont F., Tyerman S.D. Aquaporins: highly regulated channels controlling plant water relations // *Plant Physiol.* 2014. V. 164. № 4. P. 1600–1618. DOI: [10.1104/pp.113.233791](https://doi.org/10.1104/pp.113.233791)
12. Du H., Wu N., Fu J., Wang S., Li X., Xiao J., Xiong L. A GH3 family member, OsGH3-2, modulates auxin and abscisic acid levels and differentially affects drought and cold tolerance in rice // *J. Exp. Bot.* 2012. V. 63. № 18. P. 6467–6480. DOI: [10.1093/jxb/ers300](https://doi.org/10.1093/jxb/ers300)
13. Fang J., Chu C. Absciscic acid and the pre-harvest sprouting in cereals // *Plant Signal Behav.* 2008. V. 3. № 12. P. 1046–1048.
14. Nambara E., Okamoto M., Tatematsu K., Yano R., Seo M., Kamiya Y. Absciscic acid and the control of seed dormancy and germination // *Seed Sci. Res.* 2010. V. 20. № 2. P. 55–67. DOI: [10.1017/S0960258510000012](https://doi.org/10.1017/S0960258510000012)
15. Horie T., Kaneko T., Sugimoto G., Sasano S., Panda S.K., Shibasaka M., Katsuhara M. Mechanisms of water transport mediated by PIP aquaporins and their regulation via phosphorylation events under salinity stress in barley roots // *Plant Cell Physiol.* 2011. V. 52. № 4. P. 663–675. DOI: [10.1093/pcp/pcr027](https://doi.org/10.1093/pcp/pcr027)
16. Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Kruglova N.N., Zaytsev D.Yu., Veselov S.Yu. Changes in distribution of cytokinins and auxins in cell during callus induction and organogenesis *in vitro* in immature embryo culture of wheat // *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 2016. V. 52. № 3. P. 251–264. DOI: [10.1007/s11627-016-9767-4](https://doi.org/10.1007/s11627-016-9767-4)
17. Sharipova G., Veselov D., Kudoyarova G., Fricke W., Dodd Ia.C., Katsuhara M., Furuichi T., Ivanov I., Veselov S. Exogenous application of abscisic acid (ABA) increases root and cell hydraulic conductivity and abundance of some aquaporin isoforms in the ABA-deficient barley mutant AZ34 // *Ann. Bot.* 2016. V. 118. № 4. C. 777–785. DOI: [10.1093/aob/mcw117](https://doi.org/10.1093/aob/mcw117)
18. Suzuki T., Matsuura T., Kawakami N. et al. Accumulation and leakage of abscisic acid during embryo development and seed dormancy in wheat // *Plant Growth Regul.* 2000. V. 30. P. 253–260. DOI: [10.1023/A:1006320614530](https://doi.org/10.1023/A:1006320614530)
19. Veselov D.S., Sharipova G.V., Veselov S.Yu., Dodd Ia.C., Ivanov I., Kudoyarova G.R. Rapid changes in root HvPIP2;2 aquaporins abundance and ABA concentration are required to enhance root hydraulic conductivity and maintain leaf water potential in response to increased evaporative demand // *Funct. Plant Biol.* 2018. V. 45. № 2. C. 143–149. DOI: [10.1071/FP16242](https://doi.org/10.1071/FP16242)