

УДК 581.1

ПОТЕРЯ УСТОЙЧИВОСТИ К ОБЕЗВОЖИВАНИЮ У ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЯН *BRASSICA OLERACEAE* L. С РАЗНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ОСТАТОЧНЫХ ХЛОРОФИЛЛОВ

Г. Н. Смоликова

Санкт-Петербургский государственный университет

Приобретение устойчивости к обезвоживанию и деградация хлорофиллов являются важными процессами при созревании «ортодоксальных семян», однако хлорофиллы разрушаются не полностью и присутствуют в остаточных количествах в физиологически зрелых семенах многих видов растений. В работе изучена зависимость между содержанием остаточных хлорофиллов и устойчивостью к обезвоживанию у прорастающих семян капусты белокочанной. Показано, что на этапе прорастания, предшествующем проклевыванию зародышевого корешка, у семян с более высоким содержанием хлорофиллов устойчивость к обезвоживанию снижалась. Это проявлялось в задержке инициации клеточного цикла, снижении скорости прорастания и всхожести. Одной из причин снижения устойчивости может быть то, что присутствующие в семенах хлорофиллы оказывают повреждающее действие путем усиления окислительного стресса.

Ключевые слова: *Brassica oleraceae* L., семена, деградация хлорофиллов, устойчивость к обезвоживанию, прорастание семян.

G. N. Smolikova. LOSS OF TOLERANCE TO DESICCATION DURING GERMINATION OF *BRASSICA OLERACEAE* L. SEEDS WITH DIFFERENT CONTENT OF RESIDUAL CHLOROPHYLLS

Development of tolerance to desiccation and degradation of chlorophylls are important processes in the maturation of orthodox seeds. However, chlorophylls do not degrade completely and are present in residual quantities in mature seeds of many plant species. We studied the relationship between the content of residual chlorophylls and tolerance to desiccation in germinating cabbage seeds. It was shown that the seeds with higher content of chlorophylls were less tolerant of desiccation at the stage of germination before radical protrusion. The manifestations were delay in cell cycle activation in the seed radicle, lowering of viability and germination rate. One of the presumable reasons for the decrease in seed tolerance is that chlorophylls may damage the cells by intensifying oxidative stress.

Key words: *Brassica oleraceae* L., seeds, chlorophylls degradation, tolerance of desiccation, seed germination.

Введение

Процесс обезвоживания рассматривается как необходимое событие жизненного цикла у

видов, продуцирующих так называемые ортодоксальные семена [Roberts, 1973]. При развитии ортодоксальных семян на материнском растении в них происходит потеря воды, что

совпадает с приобретением зародышами устойчивости к обезвоживанию. Обычно теряется свыше 80% воды, в результате активность метаболических процессов резко снижается, а семена переходят в состояние покоя [Хукстра, Головина, 1999; Golovina et al., 2001]. Очень важен тот факт, что вместе с устойчивостью к обезвоживанию семена приобретают неспецифическую устойчивость и к другим стрессорам окружающей среды.

При благоприятных условиях увлажнения, температуры и освещения метаболические реакции реактивируются и начинается прорастание семян. Эти процессы хорошо описаны в обзоре Н. В. Обручевой [Obroucheva, 2010]. При этом на начальных этапах прорастания семена могут быть обратно высушены до исходного уровня влагосодержания без потери жизнеспособности.

Наряду с обезвоживанием необходимым условием завершения процесса созревания ортодоксальных семян является деградация хлорофиллов. По мере снижения влагосодержания в созревающих семенах происходят нарушение гранальной структуры хлоропластов, распад фотосистем и хлорофилл-белковых комплексов, в результате чего хлоропласты превращаются в пропластиды [Johnson-Flanagan, Thiagarajan, 1990; Borisjuk et al., 2005]. Есть основание полагать, что оба процесса – снижение содержания хлорофиллов и потеря воды – находятся под контролем одного гормона – абсцизовой кислоты [Ooms et al., 1993].

В этом контексте представляет интерес то, что в семенах многих высших растений хлорофиллы деградируют не полностью. На наличие остаточных хлорофиллов в семенах еще в 1909 г. указывали Н.А. Монтеверде и В.Н. Любименко. Более подробно этот феномен был описан в 1973 г. в монографии М.С. Яковлева и Г.Я. Жуковой «Покрытосеменные растения с зеленым и бесцветным зародышем». Авторы проанализировали семена 1094 видов из 182 семейств покрытосеменных растений и сделали вывод о том, что хлорофилл присутствует у 428 видов из 72 семейств.

Цель данной работы заключалась в выяснении существования зависимости между устойчивостью семян к обезвоживанию и присутствием в них остаточных хлорофиллов.

Материалы и методы

Семена капусты белокочанной (*Brassica oleraceae* L.) с. Bartolo сортировали по интенсивности флуоресценции хлорофиллов (ИФХ) в семенных оболочках по методу [Jalink et al., 1998] на установке SeedScan I Laser Sorter

(Sataka, USA), затем размещали на вращающемся диске с углублениями, облучали светом длиной волны 650 нм и регистрировали флуоресценцию хлорофиллов при 730 нм.

Для оценки устойчивости к обезвоживанию семена капусты инкубировали в воде в течение 24 и 48 ч, затем подсушивали до исходной влажности и после этого проращивали. Через 48 ч начиналось проклевывание семян. Для дальнейшей работы отбирали только непроклюнувшиеся семена, поскольку подсушивание семян с уже проклюнувшимся зародышевым корешком приводило к их гибели. Высушивание проводили в течение 3 суток при 22°C и 32%-ой влажности воздуха.

Для определения *влагосодержания* семян навески по 0,5 г помещали в термостат при 105° на 17 ч. Влагосодержание выражали в граммах воды на грамм сухого вещества (г/г). Для оценки *скорости прорастания и всхожести* семена проращивали на фильтровальной бумаге при 22°C. Количество проросших семян учитывали каждые сутки. Проросшими считали семена, у которых зародышевый корешок проклюнулся сквозь семенную оболочку. *Всхожесть семян* оценивали по количеству нормально развитых проростков, ненормально развитых проростков и непроросших семян через 10 дней прорастания.

Целостность мембран в семенах определяли по содержанию синапина, вышедшего из набухающих семян в инкубационный раствор, по методу [Lee et al., 1997]. Синапин (3,5-диметокси-4-гидроксициннамоилхолин) – холиновый эфир синаповой кислоты. Семена (25 шт.) помещали в 50 мл дистиллированной воды на 18 ч при 25°C. Синапин определяли по оптической плотности раствора при 322 нм на спектрофотометре СФ-46.

Определение содержания хлорофиллов а и b, каротинов и ксантофиллов. Зародыши семян растирали в смеси петролейного эфира и тетрагидрофурана (4:1, по объему). Спектры поглощения полученных экстрактов регистрировали на спектрофотометре Unikon 931 (Kontron Instr, Германия). Для расчета содержания пигментов использовали формулы, приведенные в работе О.В. Булда и др. [2008].

Клеточный цикл в зародышевых корешках семян капусты изучали на проточном цитометре Coulter Epics XL-MCL (Beckman-Coulter, USA). Растительную ткань измельчали в 1 мл охлажденного буфера, содержащего 137 мМ NaCl; 268 мкМ KCl; 0,5 мкМ K₂HPO₄; 2,0 мкМ Na₂HPO₄ с pH 7,3. После измельчения суспензию фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 30 мкм. К раствору, содержащему ядра, добавляли РНКазу (10 мкл/мл) и флуоресцентный краситель (10 мкл/мл) и инку-

бирова́ли 30 мин при 22°C. В качестве флуоресцентного красителя использовали иодистый пропидиум и 7-амино-актиномицин D. Инициацию клеточного цикла оценивали по отношению количества ядер в G₂ фазе клеточного цикла с 4С, 8С и т.д. набором ДНК к количеству ядер в G₁ фазе с 2С набором ДНК (G₂/G₁-отношение).

Результаты и обсуждение

Сортировка семян капусты на установке SeedScan I Laser Sorter позволила получить фракции с низкой и высокой интенсивностью флуоресценции хлорофиллов в семенных оболочках (далее – низкая и высокая ИФХ). Для сортировки использовали физиологически зрелые семена, собранные на стадии технической спелости. Семена полученных фракций не различались по массе (3,5 г) и содержанию воды (0,06 г/г), однако существенно отличались по количеству остаточных хлорофиллов. Зародыши семян с низкой ИФХ содержали в среднем 3 мкг/г Хл *a* и 1 мкг/г Хл *b*, а с высокой ИФХ – 32 мкг/г Хл *a* и 29 мкг/г Хл *b*, то есть наблюдалась разнокачественность семян по скорости деградации хлорофиллов при созревании. Представляло интерес, существуют ли различия по устойчивости к обезвоживанию между фракциями семян капусты с разным содержанием остаточных хлорофиллов.

На первом этапе работы была проанализирована динамика поступления воды при прорастании семян. Влагосодержание воздушно-сухих семян обеих фракций не различалось и составляло 0,06 г/г, однако при прорастании семена с высокой ИФХ набухали быстрее (табл. 1). После 24 ч прорастания влагосодержание семян с низкой ИФХ повышалось до 0,58 г/г, а с высокой ИФХ – до 0,69. Через 48 ч набухания влагосодержание непроросших семян с низкой ИФХ было равно 0,67 г/г, а с высокой ИФХ – 0,77. После прорастания эти различия нивелировались.

Мы полагаем, что различия по скорости набухания семян с разным содержанием остаточных хлорофиллов могут быть связаны с целостностью их мембран и семенных оболочек. Известно, что при набухании клеточные мембраны из гелевой фазы переходят в жидкокристаллическую, в результате чего меняется организация мембранных липидов [Хукстра, Головина, 1999]. Этот переход сопровождается кратковременным увеличением проницаемости мембран для воды и растворенных веществ. Для успешного прорастания семена должны восстановить структурную целостность мембран как можно быстрее. В противном случае слишком быстрое поступ-

ление воды будет провоцировать так называемый стресс набуханием.

В данной работе анализ целостности мембран в набухающих семенах капусты осуществляли по выходу в инкубационный раствор холинового эфира синаповой кислоты (синапина) (табл. 2). Семена набухали 18 ч, при этом влагосодержание семян повышалось с 0,06 до 0,7 г/г сух. вещества.

Таблица 1. Изменение влагосодержания (г воды / г сух. в-ва) при прорастании семян капусты, сортированных по ИФХ

Варианты	Низкая ИФХ	Высокая ИФХ
Воздушно-сухие семена	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01
24 ч прорастания	0,58 ± 0,02	0,69 ± 0,03
48 ч прорастания (нпр)	0,67 ± 0,06	0,77 ± 0,05
48 ч прорастания (пр)	0,82 ± 0,04	0,87 ± 0,05

Примечание. нпр – непроросшие семена; пр – проросшие семена; «±» – стандартная ошибка средней арифметической.

Таблица 2. Выход синапина при прорастании семян капусты, сортированных по ИФХ

Фракции	Оптическая плотность инкубационного раствора при 330 нм	
	Жизнеспособные семена	Нежизнеспособные семена
Низкая ИФХ	0,025±0,004	0,454±0,028
Высокая ИФХ	0,091±0,023	0,714±0,063

Примечание. Нежизнеспособные семена получали автоклавированием (121°C, 30 мин); «±» – стандартная ошибка средней арифметической.

Эндогенное содержание синапина у фракций семян с низкой и высокой ИФХ не различалось и составляло 0,03 ± 0,01 мкг/г абс.сух. в-ва. При этом жизнеспособные семена с высоким ИФХ выделяли в инкубационный раствор в 3,5 раза больше синапина, чем жизнеспособные семена с низким ИФХ. Это свидетельствует о том, что у семян с высоким ИФХ целостность клеточных мембран была ниже, чем у семян с низким ИФХ. Различия по выходу синапина сохранялись и при набухании нежизнеспособных семян, которые получали путем автоклавирования. Поскольку клеточные мембраны после автоклавирования переставали функционировать, то факт присутствия разных количеств синапина в инкубационном растворе может быть связан только с различиями в целостности семенных оболочек.

Как известно, потеря устойчивости к обезвоживанию происходит у семян в процессе прорастания [Dasgupta et al., 1988; Faria et al., 2004]. В наших экспериментах семена капусты инкубировали в воде в течение 24 и 48 ч и далее высушивали до исходного влагосодержа-

ния (см. табл. 1). Хотелось бы обратить внимание на то, что видимое прорастание семян, сопровождающееся проклевыванием зародышевого корешка, начиналось через 48 ч, поэтому семена делили на две партии – непроросшие и проросшие (с визуально определяемым зародышевым корешком). Высушиванию подвергли только непроросшие семена. Устойчивость семян к обезвоживанию оценивали по их способности прорасти и формировать нормально развитые проростки после высушивания (рис. 1, 2).

Семена с низкой ИФХ имели 100%-ю всхожесть и формировали нормально развитые проростки. На 2-й день в этой фракции проросло 14 % семян, на 3-й – 79, а на 4-й – 98. В случае, когда прорастание семян было пре-

рвано высушиванием как через 24 ч, так и через 48 ч, всхожесть и количество нормально развитых проростков не снижались, а скорость прорастания значительно увеличивалась (до 32 и 56 % семян на 2-й день прорастания соответственно). Все это говорит о том, что семена с низкой ИФХ сохраняли устойчивость к обезвоживанию на всех этапах прорастания. Высушивание не только не снижало жизнеспособность семян, но и повышало скорость их прорастания при последующей гидратации. Это связано с тем, что метаболические процессы, инициирующие прорастание, при высушивании задерживаются и при повторном поступлении воды идут дальше. На данном эффекте основаны предпосевные обработки семян методом замачивания-высушивания и осмопрайминга.

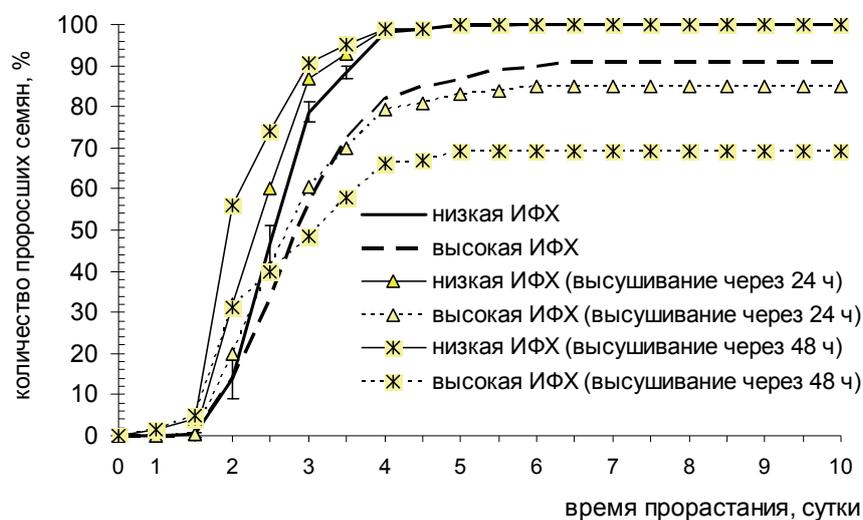


Рис. 1. Динамика прорастания семян капусты, сортированных по ИФХ, в связи с их высушиванием через 24 и 48 ч прорастания

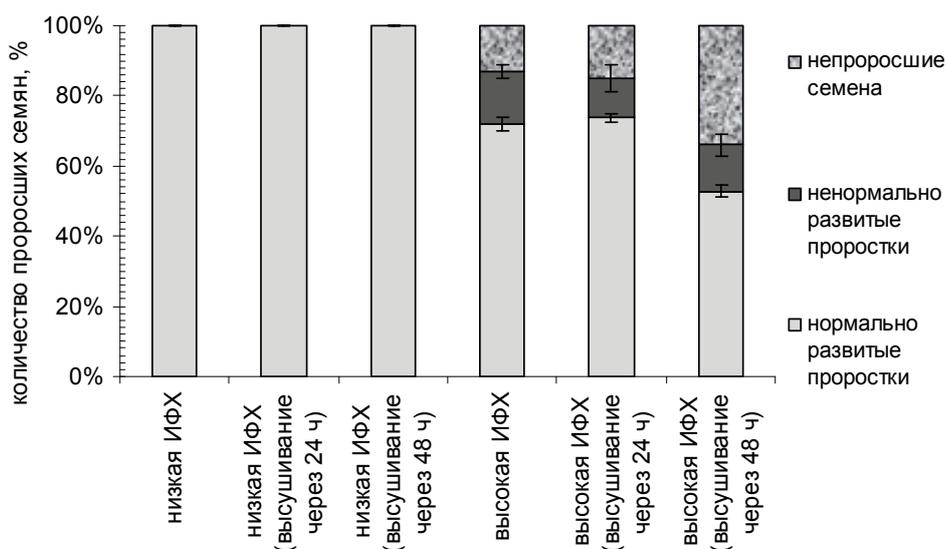


Рис. 2. Развитие проростков капусты, сортированных по ИФХ, в связи с высушиванием семян через 24 и 48 ч прорастания

Семена с высокой ИФХ имели всхожесть 87 %, при этом 15 % проростков развивались с морфологическими нарушениями (см. рис. 2). В случае, когда прорастание семян было прервано высушиванием через 24 ч, всхожесть и количество нормально развитых проростков не снижались, а скорость прорастания увеличивалась (так же как и у семян с низкой ИФХ). Вместе с тем высушивание семян через 48 ч набухания приводило к существенной потере их жизнеспособности: всхожесть семян снижалась до 69 %.

Таким образом, потеря устойчивости к обезвоживанию у семян капусты происходит непосредственно перед или в момент проклевывания зародышевого корешка сквозь семенную оболочку. В этот период прорастания проявлялись различия между семенами с разным содержанием остаточных хлорофиллов, поэтому его можно рассматривать как критический (переходный).

Представляло интерес изучить, как потеря устойчивости к обезвоживанию соотносится с особенностями инициации клеточного цикла в клетках зародышевых корешков семян. Известно, что большинство клеток меристематических тканей в зародышах воздушно-сухих семян находятся на пресинтетической фазе клеточного цикла (G_1) или переходят в фазу покоя (G_0) [De Castro, 1998]. В диплоидных соматических клетках, к которым относятся клетки семян капусты, на фазе G_0/G_1 ядра содержат 2С набор ДНК (С – количество ДНК, содержащееся в гаплоидном наборе хромосом). Такие клетки характеризуются отсутствием сигналов к делению, и индукция клеточного цикла происходит только под действием внешнего стимула, которым при прорастании семян является

вода. При набухании клетки зародышей переходят от фазы G_0/G_1 к фазе S/G_2 с удвоенным (4С) набором ДНК в ядрах. Протяженность этого перехода определяется количеством и скоростью репарации имеющихся в ДНК повреждений [Osborne, 1994].

В наших исследованиях, проведенных с использованием проточной цитометрии, было установлено, что около 80 % ядер в клетках зародышевых корешков воздушно-сухих семян капусты содержали 2С набор ДНК и около 20 % ядер «уходили» в покой с 4С набором ДНК. При этом статистически достоверной разницы между воздушно-сухими семенами с разным содержанием остаточного хлорофилла не обнаружено. Для оценки динамики инициации клеточного цикла мы изучали отношение количества ядер в G_2 фазе клеточного цикла к количеству ядер в G_1 фазе (G_2/G_1 -отношение) (рис. 3).

Через 24 ч прорастания G_2/G_1 -отношение в клетках зародышевых корешков семян с высокой ИФХ не изменялось и составляло 0,11, а у семян с низкой ИФХ повышалось с 0,13 до 0,23. Через 48 ч прорастания непосредственно перед проклевыванием зародышевого корешка в семенах с низкой ИФХ G_2/G_1 -отношение повышалось до 0,7, а в семенах с высокой ИФХ – до 0,2. Поскольку инициации клеточного цикла в этот момент еще не наступало, незначительное повышение данного показателя можно объяснить репарацией ДНК. Инициация клеточного цикла в зародышевых корешках семян капусты совпадает с удлинением клеток и видимым проклевыванием зародышевого корешка сквозь семенную оболочку. Она характеризовалась быстрым переходом ядер из G_1 в G_2 фазу клеточного цикла, в результате G_2/G_1 -

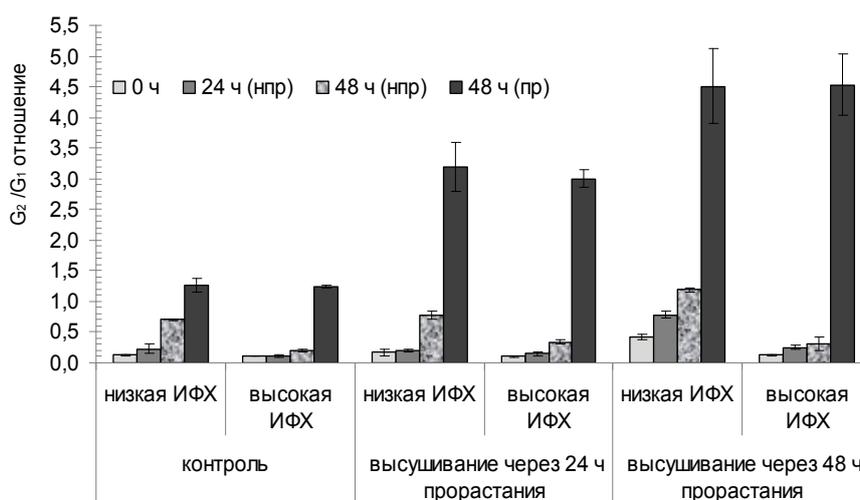


Рис. 3. Динамика отношения количества ядер в G_2 фазе клеточного цикла к количеству ядер в G_1 фазе (G_2/G_1 -отношение) в прорастающих зародышевых корешках семян капусты

Высушивание – семена инкубировали в воде 24 и 48 ч и затем высушивали; нпр – непроклюнувшиеся семена; пр – проклюнувшиеся семена

отношение в семенах обеих фракций увеличилось до 1,2.

Высушивание семян через 24 ч прорастания привело к возвращению G_2/G_1 -отношения до 0,17 у семян с низкой ИФХ и до 0,10 у семян с высокой ИФХ. Далее при повторной гидратации G_2/G_1 -отношение опять постепенно повышалось до момента проклевывания зародышевого корешка, причем у семян с низкой ИФХ оно было выше, чем у семян с высокой ИФХ. Интересно, что в проклюнувшихся зародышевых корешках G_2/G_1 -отношение было выше, чем при прорастании контрольных семян (3,1 по сравнению с 1,2).

Такая же тенденция наблюдалась и у семян, которые высушивали через 48 ч прорастания. Высушенные семена с низкой ИФХ имели G_2/G_1 -отношение, равное 0,42, а с высокой ИФХ – 0,13. При прорастании семян с низкой ИФХ G_2/G_1 -отношение в клетках повышалось быстрее, и к моменту проклевывания оно составляло 1,19 по сравнению с 0,31 у семян с высокой ИФХ. В проклюнувшихся зародышевых корешках G_2/G_1 отношение увеличивалось до 4,5.

Анализ динамики инициации клеточного цикла в зародышевых корешках прорастающих семян капусты подтверждает эффекты, полученные при оценке скорости прорастания и всхожести семян. Семена с низкой ИФХ при высушивании как через 24 ч, так и через 48 ч прорастания имели более высокое отношение G_2/G_1 по сравнению с семенами с высокой ИФХ. Это говорит о том, что повреждения ДНК при высушивании семян с низкой ИФХ не происходило. В то же время наблюдалось значительное снижение G_2/G_1 -отношения в семенах с высокой ИФХ, подвергнутых высушиванию через 48 ч прорастания, что свидетельствует о повреждении ДНК и потере устойчивости к обезвоживанию.

Таким образом, семена капусты с более высоким содержанием остаточных хлорофиллов быстрее теряли устойчивость к обезвоживанию при прорастании. Эти семена характеризовались также более высокой скоростью поступления воды при прорастании и более низкой целостностью мембран и семенных оболочек.

Причина более низкой устойчивости к обезвоживанию у семян с высоким содержанием остаточных хлорофиллов может быть связана с тем, что хлорофиллы оказывают повреждающее действие на семена путем усиления окислительного стресса. Поскольку хлорофиллы в семенах находятся в пропластидах с разрушенной гранальной системой [Johnson-Flanagan, Thiagarajan, 1990; Borisjuk et al., 2005], система акцептирования электронов при возбуждении электронов хлорофиллов не работает подобно тому, как это происходит в хлоропластах. В результате энергия воз-

буждения будет рассеиваться или в виде флуоресценции, или путем образования синглетного кислорода, вызывая окисление органических соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 11-04-00701а). Автор благодарит доктора С. Грута и Я. Бергервоета (Международный центр по исследованию растений г. Вагенинген, Нидерланды) за предоставление семян и проведение проточно-цитометрических исследований.

Литература

Булда (Борискевич) О. В., Рассадина В. В., Алексейчук (Смоликова) Г. Н., Ламан Н. А. Спектрофотометрический метод определения содержания каротинов, ксантофиллов и хлорофиллов в экстрактах семян растений // Физиология растений. 2008. Т. 55. С. 604–611.

Монтеверде Н. А., Любименко В. Н. О зеленом пигменте внутренней оболочки семян *Cucurbitaceae* и его отношении к хлорофиллу // Изв. Санкт-Петербургского бот. сада. 1909. Т. 9. С. 2–3.

Хукстра Ф. А., Головина Е. А. Поведение мембран при дегидратации и устойчивость ангидробиотических организмов к обезвоживанию // Физиология растений. 1999. Т. 46, № 3. С. 347–361.

Яковлев М. С., Жукова Г. Я. Покрытосеменные растения с зеленым и бесцветным зародышем (хлоро- и лейкоэмбриофиты). Л.: Наука, 1973. 116 с.

Borisjuk L., Nguyen T. H., Neuberger T. et al. Gradients of lipid storage, photosynthesis and plastid differentiation in developing soybean seeds // New Phyt. 2005. Vol. 167. P. 761–776.

Dasgupta J., Bewley J. D., Yeung E. C. Desiccation-tolerant and desiccation-intolerant stages during development and germination of *Phaseolus vulgaris* seeds // J. Exp. Botany. 1988. Vol. 33. P. 1045–1057.

De Castro R. D. A functional analysis of cell cycle events in developing and germinating tomato seeds: PhD thesis. 1998. 110 p.

Faria R., van Lammeren J. M., Hilhorst H. W. M. Desiccation sensitivity and cell cycle aspects in seeds of *Inga vera* subsp. *Affinis* // Seed Science Research. 2004. Vol. 14. P. 165–179.

Golovina E. A., Hoekstra F. A., van Aelst A. C. The competence to acquire cellular desiccation tolerance is dependent of seed morphological development // J. Exp. Bot. 2001. Vol. 52. P. 1015–1027.

Jalink H., van der Schoor R., Frandas A. et al. Chlorophyll fluorescence of *Brassica oleracea* seeds as a non-destructive marker for seed maturity and seed performance // Seed Science Research. 1998. Vol. 8. P. 437–443.

Johnson-Flanagan A. M., Thiagarajan M. R. Degreening in canola (*Brassica napus*, cv. Westar) embryos under optimum conditions // J. Plant Phys. 1990. Vol. 136. P. 180–186.

Lee P. C., Taylor A. G. Sinapine leakage for detection of seed quality in *Brassica* // in Basic and Applied Aspects

of Seed Biology / Ed. R.H. Ellis. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997. P. 537–545.

Obroucheva N. V. Distinct regulatory patterns of seed dormancy release and germination commencement // *Seed Science and Technology*. 2010. Vol. 38. P. 265–279.

Ooms J. J., Leon-Kloosterziel K. M., Bartel D. et al. Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds of *Arabidopsis thaliana*. A comparative study

using abscisic acid-insensitive *abi3* mutants // *Plant Physiol*. 1993. Vol. 102. P. 1185–1191.

Osborne D. J., Boubriak I. I. DNA and desiccation tolerance // *Seed Science Research*. 1994. Vol. 4. P. 175–185.

Roberts E. H. Predicting the storage life of seeds // *Seed Science and Technology*. 1973. N 1. P. 499–514.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ:

Смоликова Галина Николаевна

ведущий научный сотрудник, к.б.н.
Санкт-Петербургский государственный университет
биолого-почвенный факультет
кафедра физиологии и биохимии растений
Университетская наб., 7/9
199034, Санкт-Петербург, Россия
эл. почта: galina.smolikova@gmail.com
тел.: (812)3289695

Smolikova, Galina

Plant Physiology and Biochemistry Department
Faculty of Biology and Soil Sciences
Saint-Petersburg State University
Universitetskaya nab., 7/9,
St. Petersburg, 199034, Russia
e-mail: galina.smolikova@gmail.com
tel: (812)3289695