



# ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



## ВЛИЯНИЕ АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОДУКЦИЮ ПЕРЕКИСИ ПРИ ПРОРАСТАНИИ СЕМЯН И ВЕТВЛЕНИИ КОРНЕЙ РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ

**Ахиярова Г.Р., Иванов Р.С., Веселов Д.С.,  
Кудоярова Г.Р.**

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального  
исследовательского центра РАН  
E-mail: [akhyarova@rambler.ru](mailto:akhyarova@rambler.ru)

Было изучено как влияет абсцизовая кислота (АБК) на продукцию активных форм кислорода (АФК) в области формирования боковых корней и при прорастании семян ячменя. В качестве объекта исследований был использован дефицитный по АБК мутант ячменя, у которого уровень собственного гормона был понижен. Для выявления АФК в тканях растений использовали диаминобензидин (ДАБ). Обнаружено, что ингибирование прорастания семян под влиянием АБК связано со снижением уровня АФК. На основании полученных результатов сделано предположение, что перекись влияла на ветвление корней не непосредственно, а через индукцию экспрессии генов, контролирующих этот процесс. Полученные данные свидетельствуют против предположения о том, что АФК могут влиять на прорастание боковых корней, непосредственно воздействуя на компоненты клеточных стенок, как это происходит при прорастании.

*Ключевые слова:* *Hordeum vulgare* L., абсцизовая кислота, активные формы кислорода, прорастание семян, ветвление корней

## INFLUENCE OF ABSCISIC ACID ON PEROXIDE PRODUCTION DURING SEED GERMINATION AND ROOT BRANCHING OF BARLEY PLANTS

**Akhiyarova G.R., Ivanov R.S., Veselov D.S.,  
Kudoyarova G.R.**

Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre  
of the Russian Academy of Sciences, Ufa  
E-mail: [akhyarova@rambler.ru](mailto:akhyarova@rambler.ru)

We studied the effect of abscisic acid (ABA) on production of reactive oxygen species (ROS) at the site of lateral roots formation and during germination of barley. The work was performed using ABA deficient mutant of barley with decreased level of its own hormone. Diaminobenzidine (DAB) was used for detection of ROS in the plant tissues. It was discovered that inhibition of germination by ABA is linked to decreased ROS level. On the base of obtained results, we suggest that hydrogen peroxide acted on root branching indirectly through expression of genes controlling this process. The obtained data refute suggestion that ROS may affect lateral root emergence acting directly on components of cell walls as they do during germination.

*Keywords:* *Hordeum vulgare* L., abscisic acid, reactive oxygen species, seed germination, root branching

*Поступила в редакцию: 29.11.2019*

[DOI: 10.31163/2618-964X-2019-2-4-582-587](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-4-582-587)

### ВВЕДЕНИЕ

Взаимодействие гормонов и активных форм кислорода (АФК) играет важную роль в регуляции роста и развития растений. Ранее нами было показано, что накопление абсцизовой кислоты (АБК) в примордиях боковых корней растений ячменя приводит к снижению содержания в них ауксинов и подавлению ветвления при осмотическом стрессе [Ахиярова и др., 2017; 2017а; 2018; 2018а]. Предположение о том, что между этими эффектами существует причинно-следственная связь, базировалось на данных об отсутствии снижения уровня ауксинов в примордиях дефицитного по АБК мутанта и способности экзогенной АБК уменьшать содержание ауксинов в корнях мутанта. Однако механизм влияния АБК на содержание ауксинов в примордиях оставался неясным. В работе, посвященной роли

продуцируемых в митохондриях активных форм кислорода во взаимодействии АБК и ауксинов, утверждалось, что накопление АФК под влиянием АБК является причиной снижения уровня ауксинов, поскольку эти гормоны деградируют в результате их окисления активными формами кислорода [He et al., 2012]. Однако повышенное образование АФК под влиянием АБК наблюдалось не во всех случаях, и ингибирование прорастания семян под влиянием АБК объясняли не повышением, а снижением под влиянием этого гормона уровня АФК, роль которого при прорастании объясняли его способностью разрыхлять оболочки семян, которые должен преодолеть прорастающий корень [Müller et al., 2009]. Поэтому важно было проверить, как влияет АБК на продукцию АФК в области формирования боковых корней, что и было сделано в данной работе. Параллельно мы проверили влияние АБК на образование АФК при прорастании семян ячменя. Это важно было сделать потому, что эксперименты, в которых было выявлено влияние АБК на уровень АФК при прорастании [Müller et al., 2009], проводили на двудольных растениях. Представляло интерес выяснить, как влияет этот гормон на образование АФК при прорастании однодольных растений ячменя. В качестве объекта исследований был использован дефицитный по АБК мутант ячменя (AZ34), у которого уровень собственного гормона был понижен, но сохранялась чувствительность к нему [Sharipova et al., 2016]. Для выявления АФК в тканях растений мы использовали диаминобензидин (ДАБ), который меняет окраску при взаимодействии с перекисью (одной из форм АФК).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Окрашивание АФК в прорастающих семенах ячменя*

После предварительной обработки в 2 % растворе гипохлорита натрия семена растений ячменя мутанта AZ34 переносили в стаканы с водой, ставили в темноту и интенсивно аэрировали в течение суток. В один из стаканов добавляли экзогенную АБК (0,1 мг/л). Для выявления АФК прорастающие зародыши ячменя помещали в раствор 3,3'-диаминобензидина (ДАБ) в концентрации 0,5 мг/мл, приготовленном на 0,1 М фосфатном буфере (ФБ) (рН 7,2) на 5 минут под вакуум. Реакцию останавливали 50% этанолом. После этого прорастающие семена разрезали пополам вдоль острым скальпелем и полученные срезы помещали на предметное стекло, заключали в глицерин и накрывали покровным стеклом. Препараты анализировали в отраженном свете с помощью стереомикроскопа для работы Technival 2 ("Carl Zeiss Jena", Германия), оборудованного цифровой камерой Canon A640 установленного на месте одного из окуляров.

### *Окрашивание АФК в тканях первичного корня растений ячменя*

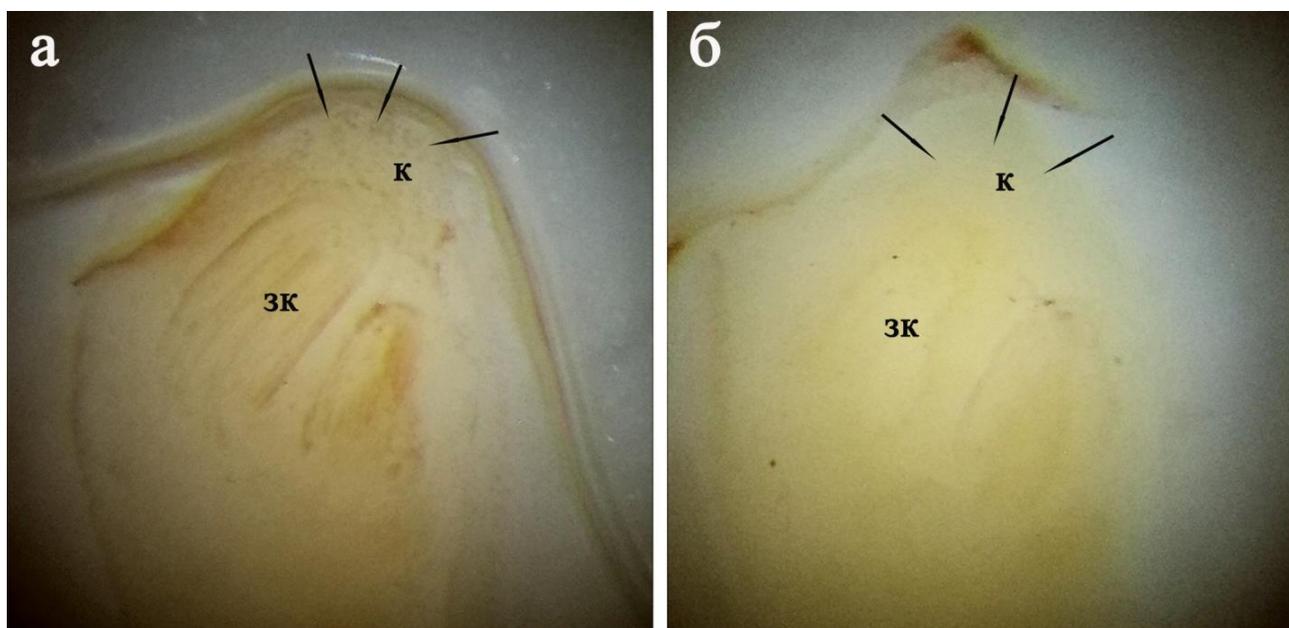
Объектом исследований являлся дефицитный по АБК мутант ячменя AZ34 (*Hordeum vulgare* L., родительская форма - сорт Steptoe). Растения выращивали в гидропонной культуре на среде Хогланда-Арнона (50%) при освещении 400 мкмоль/ м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup> ZN (спектральная лампа) и ДНАТ-400 (лампы натриевые высокого давления), 14-часовом фотопериоде, температуре воздуха 24°C и относительной влажности воздуха 40%. Перед проращиванием семена дезинфицировали в 2% растворе гипохлорита натрия в течение 10 мин и стратифицировали, выдерживая при температуре 4°C в течение двух суток. На четвертые сутки растения переносили на среду 50% Хогланда-Арнона, при этом в корневую среду половины растений экзогенно вносили АБК в конечной концентрации 0,1 мг/л. Для выявления влияния АБК на формирование АФК в тканях корня в процессе выхода примордиев боковых корней через ткани коры использовали ДАБ. Кусочки первичного корня длиной 2 см помещали в раствор

ДАБ (в течение 5 минут под вакуумом), приготовленный на 0,1 М ФБ (рН 7,2) в конечной концентрации 0,01 мг/мл на третьи сутки после внесения в среду АБК. Реакцию останавливали, помещая корни в 50% этанол. После чего кусочки корней переносили на предметное стекло, заключая в глицерин и накрывая покровным стеклом. Препараты анализировали с помощью светового микроскопа Axio Imager.A1 (“Carl Zeiss Jena”, Германия), оборудованного цифровой камерой AxioCam MRc5 (“CarlZeiss Jena”).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Влияние АБК на уровень перекиси в тканях прорастающих семян*

Окрашивание набухающих семян с помощью ДАБ выявило присутствие перекиси в тканях зародыша, что наиболее явно проявлялось в области колеоризы (рис. 1). В семенах, обработанных АБК, окрашивание АФК с помощью ДАБ не было выявлено, не удавалось различить ткани зародышевого корня и колеоризы.



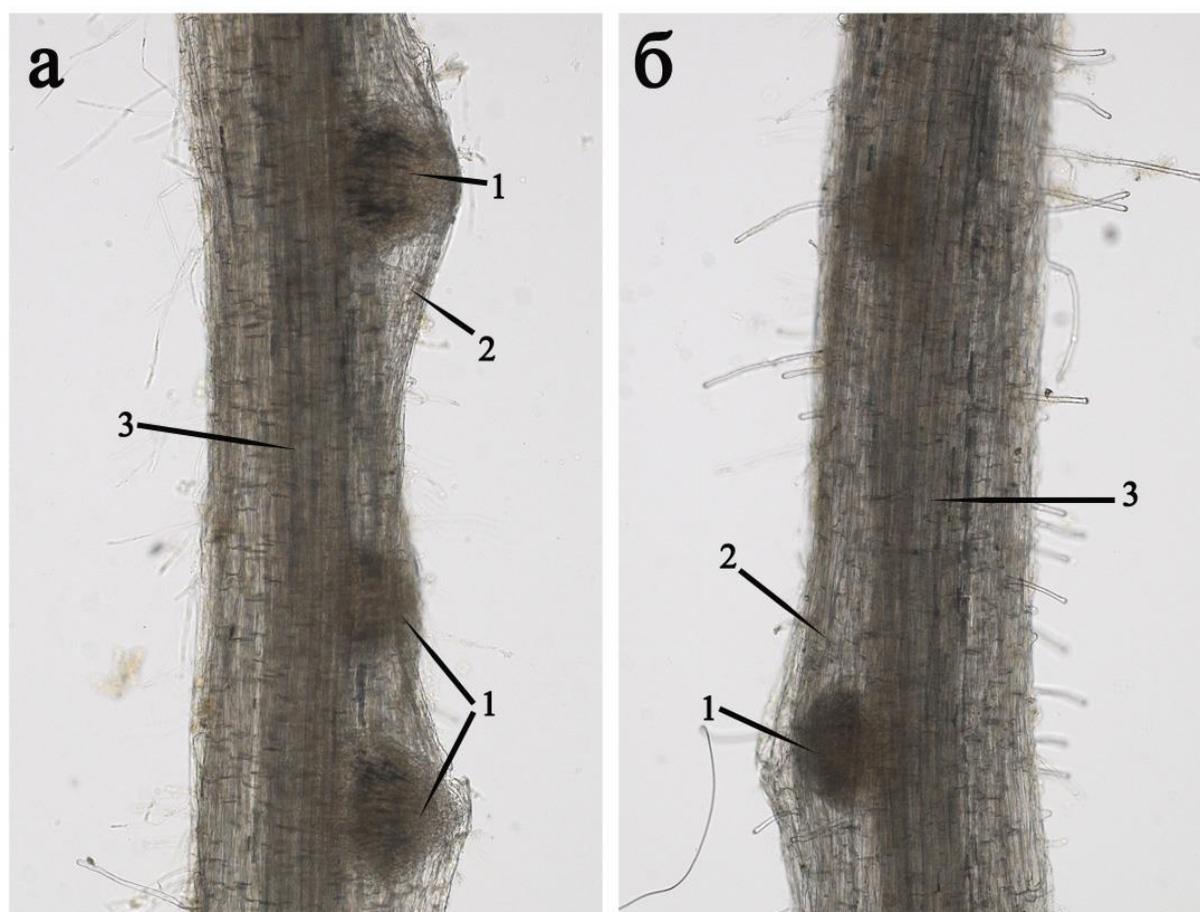
**Рис. 1. Выявление перекиси окрашиванием с помощью ДАБ в прорастающих семенах ячменя AZ34, необработанных (а) и обработанных (б) абсцизовой кислотой. к — колеориза, зк — зародышевый корень. Стрелками показана колеориза.**

Таким образом, как и в случае двудольных растений [Müller et al., 2009], мы выявили снижение уровня АФК под влиянием АБК. Различия между двудольными растениями кресс салата и однодольными растениями ячменя были обусловлены анатомическими особенностями строения их семян, и если АБК вызывала снижение уровня АФК в чехле микропилярного эндосперма (micropilar endosperm cap), то у обработанных АБК семян ячменя не было накопления перекиси в колеоризе. Сходство было в том, что и чехол микропилярного эндосперма, и колеориза являются покровными тканями семени, которые зародышевый корень должен раздвигать, продвигаясь на поверхность семени. АФК, разрыхляя эти ткани, способствует прорастанию, а АБК ингибирует процесс, снижая уровень АФК. Ранее мы показали, что обработка АБК снижает процент прорастания семян AZ34 [Ахиярова и др., 2017а]. Результаты, полученные при выполнении данной работы, свидетельствуют о том, что влияния АБК связано со снижением уровня перекиси в прорастающих семенах дефицитного по АБК мутанта. В этих же экспериментах [Ахиярова и др., 2017а] было показано, что, в отличие от мутанта, прорастание покоящихся семян растений исходного генотипа Steptoe

удавалось индуцировать с помощью перекиси, что также подтверждает роль АФК в стимуляции прорастания семян ячменя. Оценка динамики АБК в прорастающих семенах ячменя показала снижение ее уровня в колеоризе [Barbero et al., 2009], что соответствует нашим данным о более высоком уровне этого гормона в колеоризе как созревающих [Seldimirova et al., in press], так и прорастающих семян Steptoe [Ахиярова и др., 2018а], что коррелировало с пониженной способностью семян растений этого сорта к прорастанию по сравнению с мутантом [Ахиярова и др. 2017а]. В целом, полученные нами результаты подтверждают предположение о том, что ингибирование прорастания семян под влиянием АБК связано со снижением уровня АФК. Анализ данных литературы не противоречит этому предположению, поскольку показана как способность АБК индуцировать продукцию АФК [например, Sun et al., 2018], так и способствовать их инактивации за счет повышения активности антиоксидантных ферментов [Ha et al., 2018].

#### *Влияние АБК на уровень перекиси в области формирования боковых корней*

Как видно из рисунка 2, обработка АБК не оказывала существенного влияния на окрашивание перекиси ни в области примордиев боковых корней, ни в области коры между примордиями. Судя по данным литературы можно было ожидать как повышения уровня перекиси под влиянием АБК [Sun et al., 2018], так и ее снижения [Ha et al., 2018]. В первом случае можно было бы объяснить снижение окрашивания на ауксины примордиев, зарегистрированное нами при обработке растений АБК [Ахиярова и др., 2017; 2017а; 2018;



**Рис. 2. Выявление перекиси окрашиванием с помощью ДАБ в области формирующихся боковых корней у растений ячменя AZ34, необработанных (а) и обработанных в течение 3 суток (б) абсцизовой кислотой. 1 — развивающиеся примордии боковых корней, 2 — кора, 3 — центральный цилиндр корня.**

2018a], тем, что повышение уровня перекиси привело к инактивации ауксинов. То, что повышения окрашивания не было обнаружено, свидетельствует против этого предположения и говорит об участии иных механизмов в снижении уровня ауксинов под влиянием АБК. Во втором случае, т.е. если бы было зарегистрировано снижение уровня перекиси в коре, окружающей боковые корни, можно было предполагать (по аналогии с влиянием АБК на АФК при прорастании), что снижение уровня АФК способствовало повышению жесткости тканей, через которые боковые корни продвигаются к поверхности первичного корня. Однако и это предположение не подтвердилось. При изучении влияния перекиси на ветвление корней ячменя нам удалось подобрать концентрацию, при которой было зарегистрировано повышение количества боковых корней [Ахиярова и др., 2019]. Однако уже через сутки не удалось выявить усиление окрашивания с помощью ДАБ у обработанных перекисью растений, что позволило нам предположить, что перекись влияла на ветвление корней не непосредственно, а через индукцию экспрессии генов, контролирующих этот процесс. Результаты, полученные в настоящих экспериментах, также свидетельствуют против предположения о том, что АФК могут влиять на прорастание боковых корней, непосредственно воздействуя на компоненты клеточных стенок, как это происходит при прорастании.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 17-04-01477.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ахиярова Г.Р., Веселов Д.С., Абсалямова Г.Б., Веселов С.Ю., Кудоярова Г.Р. Влияние абсцизовой кислоты на инициацию и дальнейшее развитие боковых корней у растений ячменя // Биомика. 2017. Т. 9. № 4. С. 284-288.
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 / В сборнике: Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений. Роль активных форм кислорода в жизни растений Материалы II Международного симпозиума и международной научной школы. Редактор И.В. Максимов и др. 2017а. С. 56-59.
3. Ахиярова Г.Р., Иванов Р.С., Веселов Д.С., Веселов С.Ю., Кудоярова Г.Р. Влияние абсцизовой кислоты на содержание ауксинов и рост боковых корней у растений ячменя // Известия Уфимского научного центра Российской академии наук. 2018. № 3-1. С. 29-35.
4. Ахиярова Г.Р., Шарипова Г.В., Иванов И.И., Веселов Д.С., Веселов С.Ю., Кудоярова Г.Р. Аквапорины, абсцизовая кислота (АБК) и ауксины (ИУК) в прорастающих семенах дефицитного по АБК мутанта ячменя и его исходного сорта // Биомика. 2018а. Т. 10. № 4. С. 357-364. DOI: [10.31301/2221-6197.bmcs.2018-46](https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2018-46)
5. Ахиярова Г.Р., Кудоярова Г.Р., Иванов Р.С., Веселов Д.С. Влияние перекиси на ветвление корней растений ячменя / В сборнике: Экобиотех. 2019. Материалы VI Всероссийской конференции с международным участием. 2019. С. 357-360.
6. 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 Physiology. 2009. V. 150. P. 1006-1021. DOI: [10.1104/pp.109.137901](https://doi.org/10.1104/pp.109.137901)

7. Ha J.H., Kim J.H., Kim S.G., Sim H.J., Lee G., Halitschke R., Baldwin I.T., Kim J.I., Park C.M. Shoot phytochrome B modulates reactive oxygen species homeostasis in roots via abscisic acid signaling in *Arabidopsis* // *The Plant Journal*. 2018. V. 94. № 5. P.790-798. DOI: [10.1111/tpj.13902](https://doi.org/10.1111/tpj.13902)
8. He J., Duan Y., Hua D., Fan G., Wang L., Liu Y., Chen Z., Han L., Qu L.J., Gong Z. DEXH box RNA helicase-mediated mitochondrial reactive oxygen species production in *Arabidopsis* mediates crosstalk between abscisic acid and auxin signaling // *Plant Cell*. 2012. V. 24. № 5. P.1815-1833. DOI: [10.1105/tpc.112.098707](https://doi.org/10.1105/tpc.112.098707)
9. Müller K., Linkies A., Vreeburg R.A., Fry S.C., Krieger-Liszkay A., Leubner-Metzger G. *In vivo* cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth // *Plant Physiol*. 2009. V. 150. № 4. P.1855-1865. DOI: [10.1104/pp.109.139204](https://doi.org/10.1104/pp.109.139204)
10. Seldimirova O.A., Kudoyarova G.R., Katsuhara M., Galin I.R., Zaitsev D.Yu., Kruglova N.N., Veselov D.S., Veselov S.Yu. Dynamics of the contents and distribution of ABA, auxins and aquaporins in developing caryopses of an ABA-deficient barley mutant and its parental cultivar // *Seed Science Research*. In press. DOI: [10.1017/S0960258519000229](https://doi.org/10.1017/S0960258519000229)
11. Sharipova G. , Veselov D., Kudoyarova G., Fricke W., Dodd I., 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 // *Annals of Botany*. 2016. V.118. № 4. P. 777-785. DOI: [10.1093/aob/mcw117](https://doi.org/10.1093/aob/mcw117)
12. Sun L.R., Wang Y.B., He S.B., Hao F.S. Mechanisms for abscisic acid inhibition of primary root growth // *Plant Signaling & Behavior*. 2018. V.13. № 9. e1500069. DOI: [10.1080/15592324.2018.1500069](https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1500069)