

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА И ОБЕЗВОЖИВАНИЯ НА УРОВЕНЬ ПОЛ И ДЫХАНИЕ ЗАРОДЫШЕЙ СЕМЯН ГОРОХА, РОСТ ПРОРОСТКОВ И ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ЭПИКОТИЛЕЙ

© 2024 г. И. П. Генерозова^{a,*}, С. В. Васильев^a, П. А. Буцанец^a, А. Г. Шугаев^a

^aФедеральное Государственное бюджетное учреждение науки

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: igenerova@mail.ru

Поступила в редакцию 22.07.2023 г.

После доработки 11.08.2023 г.

Принята к публикации 14.08.2023 г.

Исследовали влияние предобработки 0.1 мкМ мелатонином и кратковременного обезвоживания набухающих семян на водный дефицит, уровень ПОЛ и дыхание зародышей, а также последующий рост эпикотилей проростков гороха (*Pisum sativum* L.) и окислительную активность выделенных из них митохондрий. Две группы зародышей одинакового возраста, но отличающихся по весу и по стадии развития исследовали отдельно: набухшие зародыши, но не прорвавшие оболочки семени (группа 1) и проклюнувшиеся зародыши (группа 2). Уровень водного дефицита зародышей 1 и 2 группы в отсутствие доступа воды повышался на 8.7 и 6.9% соответственно, что оказалось чувствительным для дыхательной активности зародышей. Было показано, что зародыши группы 2, прорвавшие оболочку семени и вступившие в контакт с кислородом воздуха, пережили резкий подъем дыхательной активности, который был сопряжен с повышением уровня ПОЛ, регистрируемого по накоплению продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой. Кратковременное обезвоживание тормозило дыхание зародышей этой группы, связанное с активностью цитохромного пути, но не сопровождалось возникновением окислительного стресса, а напротив, снижало уровень ПОЛ. У набухших, но не прорвавших оболочку семени зародышей группы 1 также отсутствовал окислительный стресс при обезвоживании. Предобработка мелатонином существенно повышала активность цитохромного пути дыхания у обеих групп зародышей, как в контроле, так и у подвергнутых обезвоживанию семян. У митохондрий, выделенных из эпикотилей 5-дневных проростков, выросших из семян, предобработанных мелатонином и подвергнутых обезвоживанию, наблюдалась активация окисления НАД-зависимого субстрата (малата), как в контрольных, так и в стрессовых условиях. Также было показано, что предобработка мелатонином стимулировала рост эпикотилей проростков группы 2 во всех вариантах опытов, тогда как у проростков группы 1 только после действия обезвоживания. Сделан вывод, что предобработка семян мелатонином стимулировала процесс дыхания зародышей за счет активации цитохромного пути, а также активировала окисление малатами митохондриями эпикотилей проростков и действовала как стимулятор роста эпикотилей после обезвоживания. Впервые показано, что кратковременное обезвоживание тканей зародыша может не сопровождаться окислительным стрессом.

Ключевые слова: *Pisum sativum*, дыхание зародышей, митохондрии, обработка семян мелатонином, обезвоживание семян, окислительный стресс, рост проростков, цитохромный и альтернативный путь дыхания

DOI: 10.31857/S0015330324010107, EDN: NVNEMG

ВВЕДЕНИЕ

Исследование последствий неблагоприятных воздействий на прорастающие семена имеет существенное значение для понимания процессов, лежащих в основе получения высокока-

чественного и обильного урожая. В последние годы показано, что время набухания семян и их прорастания является наиболее чувствительной и критичной стадией для развивающегося проростка и дальнейшего становления растения [1]. Этот период развития растения активно исследуется в последние годы: показана сигнальная природа регуляции прорастания семян, в которой ключевую роль играет взаимодействие гор-

Сокращения: АП — альтернативный путь дыхания, ВД — водный дефицит, ТБК-РП — продукты реакции с тиобарбитуровой кислотой, НФ — неблагоприятный абиотический фактор, СГК — салицилгидроксамовая кислота, ЦП — цитохромный путь дыхания.

монов АБА и гиббереллина при переходе растения из состояния покоя к прорастанию [2], а также изучается роль других гормонов, влияющих на восприятие семенами факторов внешней среды, на процессы пробуждения семени, активизации метаболизма, в частности, энергетического метаболизма, в первую очередь — в делящихся клетках зародыша.

Роль дыхательного метаболизма в поглощении воды у набухающих зародышей люпина исследовал Czosnowski [3], который показал зависимость между этими метаболическими процессами. Становление энергетики митохондрий в ходе биогенеза органелл в клетках прорастающих семян многие годы было предметом пристального внимания исследователей [4–6]. Поглощение кислорода тканями фиксировалось через несколько минут после поступления воды в отделенные зародыши люпина [3], семядоли гороха [7], семена растений [6, 8, 9]. При этом в лаборатории А. Pradet [8, 9] зафиксировали окислительное фосфорилирование сразу при набухании семени у всех из 12 исследованных видов растений. Ряд данных показывает, что восстановление структурной целостности и функциональной активности митохондрий семядолей гороха происходит в первые часы набухания семядолей. Лаг-фаза, продолжающаяся, по крайней мере, 1 ч [4, 5] сменяется за несколько часов набухания семян активным окислением сукцината митохондриями. Появление дыхательного контроля (ДК), равного 1.1, отмечено через 2 ч, а через 6 ч ДК равен 1.6, АДФ/О равно 0.81. Если семена салата замачивали в аэрируемой среде, как показано в работе [10], фосфорилирование начинается в течение первого часа набухания. У других семян биогенез митохондрий протекает более длительное время, что может объясняться, в частности, более плотной оболочкой семени и это отражается на поступлении воды и газообмене (например, у кукурузы) [6]. Прорастание завершается, когда растущий зародыш начинает контактировать с внешней средой — кислородом воздуха, в этот момент резко активизируется метаболизм, включая дыхание, и возрастет уровень АФК, ведущий к увеличению ПОЛ (ТБК-РП — пул соединений, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой) в тканях зародыша [11–14]. Детальное исследование, проведенное на семенах гороха, показало, что подъем уровня АФК происходит уже в начале набухания семян, а второй подъем выявлен в период выхода зародыша из оболочки семени и активизации метаболизма [15]. В норме выявленные повышения уровня АФК находятся под контролем антиоксидантной системы зародыша, и не воспринимаются растением как стрессовый фактор, в противном случае прорастание затрудняется и семя погибает [13, 14]. В последние годы все больше данных,

позволяющих предположить, что АФК играют основную регуляторную роль в процессах покоя и прорастания семян [14, 15, 16].

Воздействие на семена в этот чувствительный для растения период набухания и прорастания семени используется в последние годы для повышения сопротивляемости растений к неблагоприятным влияниям среды, для улучшения количества и качества урожая. Разработан метод “прайминга”, который кажется перспективным и широко изучается в последние годы, т.к. его применение дает положительные результаты. Он основан на предобработке семян осмотиками либо препаратами, оказывающими через сигнальную сеть положительный эффект на различные стороны метаболизма семян и развивающихся из них растений [2, 17]. Мелатонин также относится к сигнальным молекулам и, взаимодействуя с рядом фитогормонов, он включается в регуляцию процессов роста и развития растений. Обработка мелатонином семян ряда сельскохозяйственных культур оказывает положительный эффект, так предобработка 100 мкМ мелатонина семян огурца повысила скорость их прорастания, стимулировала генерацию корней, понизила деградацию хлорофилла в листьях, а также активировала ферменты антиоксидантной защиты [18]. Аналогичная обработка семян томатов повышала устойчивость корней к условиям обезвоживания, регулировала антиоксидантную систему и нивелировала повреждения ФС II листьев [19]. Предобработка семян лука-порея 5 мкМ мелатонина значительно повышала индекс прорастания семян при 7°C [20]. Предобработка семян хлопка 100 мкМ мелатонина повышала устойчивость к продолжительному обезвоживанию семян [16]. Также показана концентрационная зависимость эффекта при воздействии мелатонина — низкие концентрации не влияли либо влияли положительно, тогда как высокие концентрации гормона нередко подавляли прорастание семян [21, 22].

В то же время, в литературе встречается недостаточно работ, посвященных изучению влияния неблагоприятных факторов на метаболизм зародыша в период прорастания семени. Интересна работа [23], в которой исследовали влияние продолжительного обезвоживания набухающих семян гороха в течение 12–36 ч на дальнейшее восстановление структуры и функции митохондрий зародыша. Показано, что важным фактором при воздействии обезвоживания может оказаться не только продолжительность, но и время осуществления воздействия. Авторы пришли к заключению, что восстановление структуры и функции митохондрий гороха после неблагоприятного воздействия (обезвоживания) на набухающие семена имеет решающее значение для выживания семян после перенесенного стресса. Влияние предобработки семян антистрессовым

препаратом на проростки гороха и роль митохондриального метаболизма в поддержании стрессированных проростков нами было исследовано в предыдущей работе, в которой было показано, что предобработка семян гороха донором NO (натрий μ 2-дитиосульфато-тетра нитрозилфerratтетрагидратом – ТНКЖ-тио) предотвращала развитие окислительного стресса и снижала уровень ПОЛ у 5-дневных проростков после действия теплового шока на проростки гороха. Кроме того, обработка семян ТНКЖ-тио предотвращала стресс-индуцированные изменения в составе ЖК мембран митохондрий эпикотилей и поддерживала их энергетическую эффективность [24].

Целью настоящей работы явилось изучение потенциальной роли предобработки мелатонином семян гороха в предотвращении неблагоприятного действия обезвоживания на уровень ТБК-РП и дыхание отделенных зародышей, а также на рост этиолированных проростков и окислительную активность выделенных из них митохондрий. В отличие от предыдущих исследователей [16, 23], в настоящей работе мы воздействовали на зародыши непродолжительным обезвоживанием семян, учитывая, что в период активного насыщения зародышей водой они особенно чувствительны к прерыванию орошения [3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали семена гороха сорта “Немчиновский 100”, полученные в институте ФГБНУ “Федеральный Исследовательский Центр “Немчиновка”. Опытные семена предобрабатывали в течение часа мелатонином (0.1 мкМ), контрольные выдерживали в дистиллированной воде, затем все семена проращивали на фильтровальной бумаге, смоченной 50% раствором Хогланда. После 14 ч набухания половину семян переводили на сухую фильтровальную бумагу на 4 ч, после чего зародыши половины опытных и контрольных семян использовали для исследования, другую половину оставляли на проращивание на 5 сут. Учитывая имеющиеся в литературе данные о том, что при контакте с кислородом воздуха резко меняется метаболизм зародышей, в том числе дыхательный [26], мы разделили одновозрастные семена на 2 группы: с набухшими зародышами (группа 1) и семена, зародыши которых уже проклюнулись из оболочки семени (группа 2).

Для исследования дыхания зародыши отделяли от семени и помещали в ячейку кислородного электрода типа Кларка, содержащую среду инкубирования, в состав которой входил НЕРЕС-буфер (pH 7.25). Для определения общей скорости дыхания ($V_{\text{общ}}$), скорости альтернативного цианид-резистентного ($V_{\text{альт}}$) и остаточного

($V_{\text{ост}}$) дыхания ткани применяли ингибиторный анализ с использованием цианида калия (KCN, 2 мМ) и салицилгидроксамовой кислоты (СГК, 5 мМ). Оптимальные концентрации ингибиторов, достаточные для полного подавления соответствующих оксидаз, были определены в предварительных опытах. Активность цитохромного пути митохондриального окисления (ЦП или $V_{\text{цит}}$) определяли по степени чувствительности дыхания ткани к цианиду, а максимальную активность альтернативного пути митохондриального окисления (АП или $V_{\text{альт}}$) определяли по степени чувствительности дыхания ткани к СГК в присутствии KCN. Остаточное дыхание ткани ($V_{\text{ост}}$) измеряли по скорости поглощения кислорода тканью в присутствии KCN и СГК [27].

Выделение митохондрий из эпикотилей 5-дневных проростков, выросших из контрольных и подвергнутых действию обезвоживания и обработке мелатонином семян (семена при этом не делили на группы) осуществляли, используя единую методику дифференциального центрифугирования [28]. Этапы центрифугирования проводили на высокоскоростной центрифуге с охлаждением HITACHI CR22 G-III (“Hitachi”, Япония) при 4°C. Навеску растительного материала измельчали со средой гомогенизации в соотношении 1:4 веса ткани (г) к объему среды гомогенизации (мл) которая содержала: 0.4 М сахарозу, 20 мМ НЕРЕС-буфер (pH 8.0), 10 мМ ЭДТА, 3 мМ ДТТ и 0.1% БСА, свободный от ЖК. Гомогенат фильтровали через 4 слоя мираклоса и центрифугировали при 15000 g 5 мин. Осадок ресуспендировали в среде отмывания, содержащей: 0.4 М сахарозу, 20 мМ НЕРЕС-буфер (pH 7.4), 10 мМ ЭДТА, 0.2% БСА, свободный от ЖК и центрифугировали 5 мин при 4000 g. Отделяли супернатант и центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин. Осадок митохондрий, содержащий около 5 мг/мл белка, ресуспендировали в 1 мл среды, содержащей: 0.4 М сахарозу, 20 мМ НЕРЕС-буфер (pH 7.2) и 0.1% БСА, свободный от ЖК и хранили при 0°C.

Поглощение кислорода митохондриями измеряли полярографически с использованием кислородного электрода типа Кларка. Стандартная инкубационная среда (1 мл) содержала: 0.4 М сахарозу, 20 мМ НЕРЕС-буфер (pH 7.4), 5 мМ MgCl_2 , 5 мМ KH_2PO_4 (pH 7.4) и 0.1% БСА, свободный от ЖК. Дополнительно, в среду инкубации добавляли дыхательные субстраты – 10 мМ малат в присутствии 10 мМ глутамата, 10 мМ сукцинат, а также 100 или 200 мкМ АДФ. Содержание белка митохондрий определяли по методу Бредфорда с БСА в качестве стандарта.

Активность различных путей митохондриального окисления определяли с использованием ингибиторного анализа. Активность ЦП определяли по степени ингибирования окис-

ления субстратов митохондриями в состоянии 3 в присутствии 2 мМ KCN. Максимальную активность цианид-резистентного АП митохондриального окисления определяли по степени ингибирования окисления субстратов после добавки 2 мМ СГК в присутствии цианида. Оптимальные концентрации ингибиторов были подобраны в ходе предварительных экспериментов путем титрования.

Водный дефицит тканей зародышей гороха определяли в соответствии со следующей формулой [29]:

$$\text{Водный дефицит} = \frac{\text{тургесцентный вес} - \text{начальный вес}}{\text{тургесцентный вес} - \text{сухой вес}} \times 100.$$

Содержание ТБК-РП в зародышах определяли по методу [30]. Навеску ткани (1 г) гомогенизировали с 25 мл водно-этанольного раствора в пропорции 20/80, затем пробы центрифугировали при 3000 g 10 мин. Далее 1 мл аликвоты добавляли в пробирки, содержавшие 20% ТХУ (–ТБК раствор) или содержавшие в дополнение к ТХУ, 65% ТБК (+ТБК раствор). Образцы выдерживали на водяной бане при температуре 95°C в течение 30 мин, немедленно охлаждали и центрифугировали 10 мин при 3000 g. Интенсивность окрашивания супернатанта определяли на спектрофотометре Genesis 10uv при трех длинах волн (440, 532 и 600 нм). Содержание ТБК-РП определяли, используя следующий алгоритм расчета:

1. $(A_{532}(+)ТБК - A_{600}(+)ТБК) - (A_{532}(-)ТБК - A_{600}(-)ТБК) = A$,

2. $(A_{440}(+)ТБК - A_{600}(+)ТБК) \times 0.0571 = B$,

3. $ТБК\text{-}РП \text{ (нмоль/мл)} = [(A - B) \times 157000] \times 10^6$.

Для исследования длины эпикотилей этиолированных проростков, семена контрольные и подвергнутые предобработке 0.1 мкМ мелатонином и обезвоживанию, разделяли на 8 вариантов – контрольные, предобработанные мелатонином, подвергнутые обезвоживанию и предобработанные мелатонином и прошедшие обезвоживание, внутри указанных групп семена делили на проросшие – прорвавшие оболочку семени и семена с набухшим зародышем. Все 8 групп выращивали отдельно на фильтровальной бумаге на 50% растворе Хогланда. Измерение длины эпикотиля проводили через 5 сут с помощью линейки с нониусом.

В таблицах и на графиках представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. В работе приведены данные опытов, имеющих 3–5 – кратную биологическую повторность. Статистически значимые различия между средними значениями определяли с помощью Tukey теста в программе ANOVA, результаты, отмеченные разными буквами, статистически значимы при $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние обезвоживания и предобработки мелатонином на водный дефицит тканей зародышей

У зародышей из набухших семян (группа 1) водный дефицит в контроле был невысоким – 8%, у зародышей из проклюнувшихся семян (группа 2) – 11%, что соответствует норме у травянистых растений. Обезвоживание стимулировало водный дефицит у обеих групп зародышей до 17–18% (рис. 1). Предобработка мелатонином не влияла на водный дефицит в контроле у зародышей 2 группы, тогда как у 1 группы этот показатель возрастал почти в 3 раза, достигая 21%. В варианте с предобработкой мелатонином обезвоженных семян, водный дефицит в тканях зародышей достигал самых высоких значений для обеих групп семян – 22% для первой группы и 24% для второй. Можно предположить, что мелатонин стимулировал накопление метаболитов, способствуя повышению водного дефицита тканей зародыша (рис. 1).

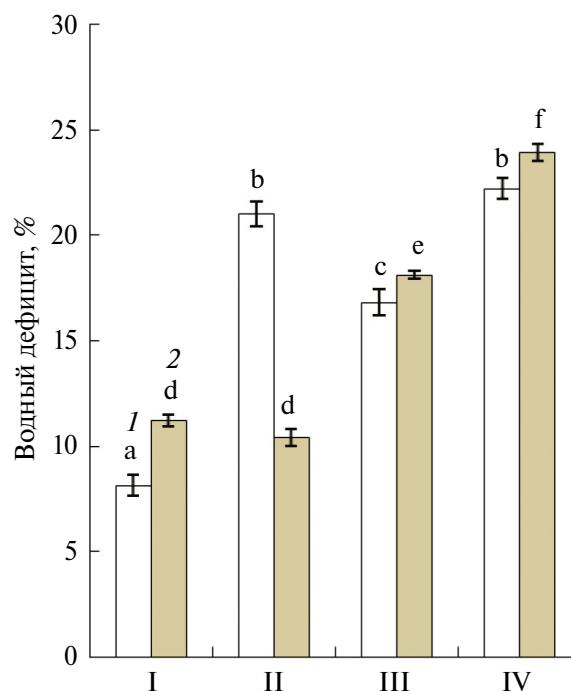


Рис. 1. Влияние обезвоживания и обработки мелатонином на водный дефицит тканей зародышей группы 1 (I) и группы 2 (II) 18-часовых семян гороха. Варианты опытов: I – контрольные семена, II – семена после обработки мелатонином, III – семена после обезвоживания, IV – семена после обезвоживания и обработки мелатонином. На рисунках представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Статистически значимые различия между средними значениями определяли с помощью Tukey теста в программе ANOVA, результаты, отмеченные разными буквами, статистически значимы при $P \leq 0.05$.

*Влияние предобработки мелатонином
и обезвоживания семян
на содержание ТБК-РП в зародышах*

Судя по полученным результатам, у зародышей из семян группы 1, содержание ТБК-РП в контроле и в условиях обезвоживания было примерно одинаково. Т.е. у этих зародышей действие НФ, по-видимому, не создавало условий для возникновения окислительного стресса. Однако предобработка мелатонином снижала уровень ТБК-РП у зародышей в контрольных семенах на 70%, а в семенах подвергнутых действию обезвоживания — на 50% (рис. 2). Содержание ТБК-РП в зародышах семян группы 2 в контроле было намного выше, чем в зародышах группы 1, а также выше, чем при обезвоживании на 58%. Предобработка семян мелатонином снизила содержание ТБК-РП у этих зародышей в контроле на 63%, в условиях обезвоживания — на 21%. При этом, у зародышей из семян группы 2 содержание ТБК-РП во всех вариантах было выше по сравнению с не проклюнувшимися зародышами (рис. 2).

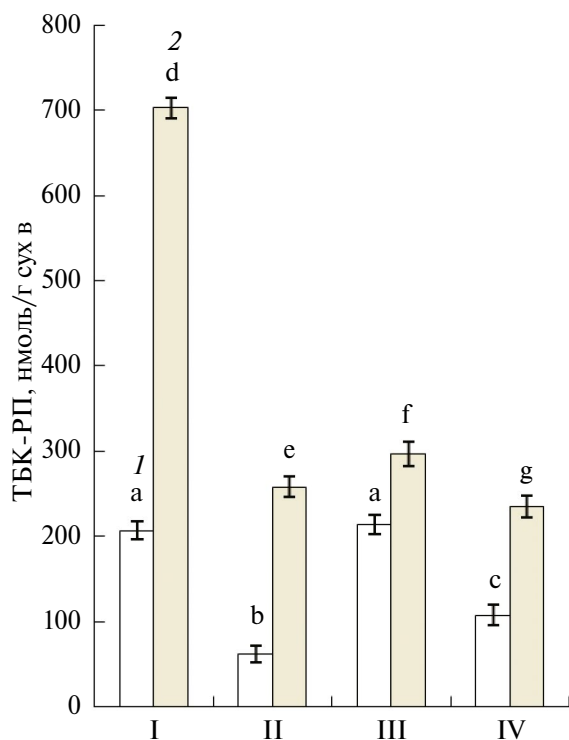


Рис. 2. Влияние обезвоживания и обработки мелатонином на содержание ТБК-РП в тканях зародышей группы 1 (I) и группы 2 (II) 18-часовых семян гороха. Варианты опытов: I — контрольные семена, II — семена после обработки мелатонином, III — семена после обезвоживания, IV — семена после обезвоживания и обработки мелатонином. На рисунках представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Статистически значимые различия между средними значениями определяли с помощью Tukey теста в программе ANOVA, результаты, отмеченные разными буквами, статистически значимы при $P \leq 0.05$.

*Влияние обезвоживания и предобработки
мелатонином на дыхание зародышей*

Дыхание отделенных зародышей из семян группы 1 в контрольном варианте осуществлялось преимущественно по цитохромному пути (ЦП), составляющему 52% от общей скорости поглощения кислорода зародышами ($V_{\text{общ}}$), тогда как максимальная активность альтернативного пути (АП) дыхания составляла только 17% (рис. 3). Предобработка семян этой группы мелатонином стимулировала $V_{\text{общ}}$ на 29%, при этом активность ЦП также существенно увеличивалась (на 87%) на фоне заметного снижения активности АП (на 77%). Отношение различных путей дыхания также увеличивалось в пользу ЦП, как за счет снижения активности АП, так и скорости остаточного дыхания ($V_{\text{ост}}$). Обезвоживание стимулировало общую скорость дыхания зародышей, а также активность ЦП и АП по сравнению с контролем соответственно на 10.6, 39.7 и 41.6%. Предобработка семян мелатонином в варианте IV (мелатонин + обезвоживание) стимулировала $V_{\text{общ}}$, а также

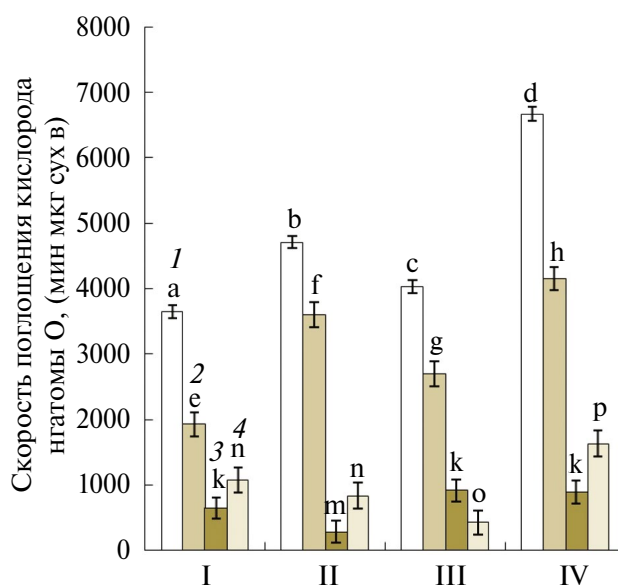


Рис. 3. Влияние обезвоживания и обработки мелатонином на скорость поглощения кислорода зародышами группы 1 18-часовых семян: (1) — скорость поглощения кислорода зародышами ($V_{\text{общ}}$); (2) — активность цитохромного пути дыхания; (3) — максимальная активность альтернативного пути дыхания; (4) — остаточное дыхание. Варианты опытов: I — контрольные семена, II — семена после обработки мелатонином, III — семена после обезвоживания, IV — семена после обезвоживания и обработки мелатонином. На рисунках представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Статистически значимые различия между средними значениями опытных и контрольных образцов определяли с помощью Tukey теста в программе ANOVA, результаты, относящиеся к соответствующему субстрату (1 или 2), отмеченные разными буквами, статистически значимы при $P \leq 0.05$.

существенно активировала ЦП по сравнению с вариантом III (обезвоживание) соответственно на 65.4 и 54% (рис. 3). Таким образом, отношение различных путей дыхания зародышей под влиянием обезвоживания набухающих семян возросло в пользу АП за счет снижения скорости остаточного дыхания.

Поглощение кислорода тканью отделенных зародышей семян группы 2 характеризовалось достаточно высокой чувствительностью к ингибитору цитохромоксидазы (цианиду), что указывало на преобладание ЦП дыхания. При этом предобработка семян мелатонином стимулировала дальнейшее увеличение активности ЦП на 39%, и в то же время снижала активность АП на 39% (рис. 4). Обезвоживание существенно тормозило интенсивность дыхания ($V_{\text{общ}}$) зародышей группы 2, при этом активность ЦП снижалась на 21%, одновременно максимальная активность АП повышалась на 32% по сравнению с контрольными растениями (рис. 4). Важно отметить, что предобработка семян мелатонином существенно (почти в два

раза) повышала активность ЦП дыхания в варианте IV (мелатонин + обезвоживание). Также заметно возрастала интенсивность дыхания ткани и уровень остаточного дыхания (рис. 4). Таким образом, предобработка семян мелатонином предотвращала ингибирование дыхания зародышей 2 группы под влиянием обезвоживания благодаря существенной активации ЦП дыхания даже по сравнению с контрольным вариантом. В целом, характеризуя влияние мелатонина на дыхание зародышей, следует отметить, что обработка гормоном у обеих групп зародышей, как в контрольных, так и в неблагоприятных условиях, “сдвигала” отношение между ЦП и АП в сторону первого, т.е. в сторону энергопоставляющей функции дыхательного метаболизма, что могло способствовать ускоренному росту проростков.

*Влияние обезвоживания
и обработки мелатонином на рост проростков
и дыхание выделенных из эпикотилей
митохондрий*

Целью исследования роста проростков и дыхания митохондрий, выделенных из эпикотилей 5-дневных проростков, было проверить возможность сохранения показанного выше эффекта предобработки мелатонином и краткосрочного обезвоживания семян на физиологические показатели не только у зародышей, но и у проростков, т.е. на более позднем этапе развития растений.

Результаты показали, что предобработка семян стимулировала рост эпикотилей 5-дневных проростков как в контрольных условиях, так и в варианте с обезвоживанием семян группы 2, у семян группы 1 – рост эпикотилей стимулировался только в условиях обезвоживания (рис. 5). При этом у семян группы 2 обезвоживание незначительно понижало длину эпикотилей, но стимуляция роста предобработкой мелатонином была более значительная, чем в контрольном варианте на 22 и 11.6% соответственно. У проростков группы 1 мелатонин вызывал снижение активности скорости роста эпикотилей в контрольном варианте. Обезвоживание значительно стимулировало рост отстающих в развитии проростков, в результате обе группы проростков почти сравнялись в размерах эпикотилей. Можно отметить, что обезвоживание послужило фактором синхронизации ростовых процессов, тогда как предобработка мелатонином семян вызвала, напротив, рассинхронизацию роста отстающих в развитии и продвинутых проростков исследуемых групп (рис. 5). В целом, обработка семян мелатонином оказывала существенное активирующее действие на рост эпикотилей проростков гороха.

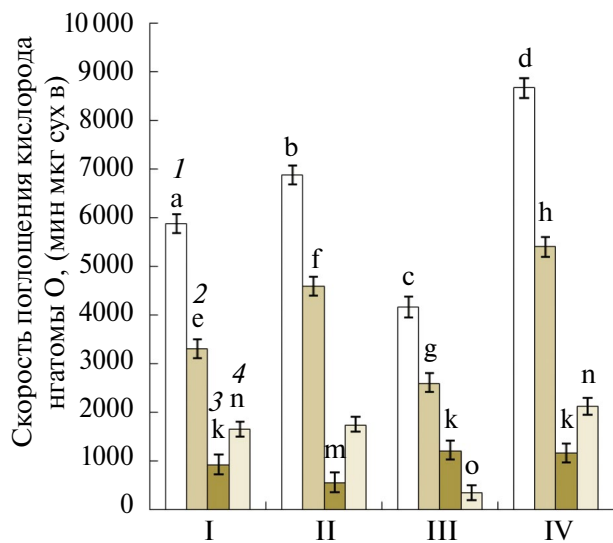


Рис. 4. Влияние обезвоживания и обработки мелатонином на скорость поглощения кислорода зародышами группы 2 18-часовых семян: (1) – скорость поглощения кислорода зародышами ($V_{\text{общ}}$); (2) – активность цитохромного пути дыхания; (3) – максимальная активность альтернативного пути дыхания; (4) – остаточное дыхание. Варианты опытов: I – контрольные семена, II – семена после обработки мелатонином, III – семена после обезвоживания, IV – семена после обезвоживания и обработки мелатонином. На рисунках представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Статистически значимые различия между средними значениями опытных и контрольных образцов определялись с помощью Tukey теста в программе ANOVA, результаты, относящиеся к соответствующему субстрату (1 или 2), отмеченные разными буквами, статистически значимы при $P \leq 0.05$.

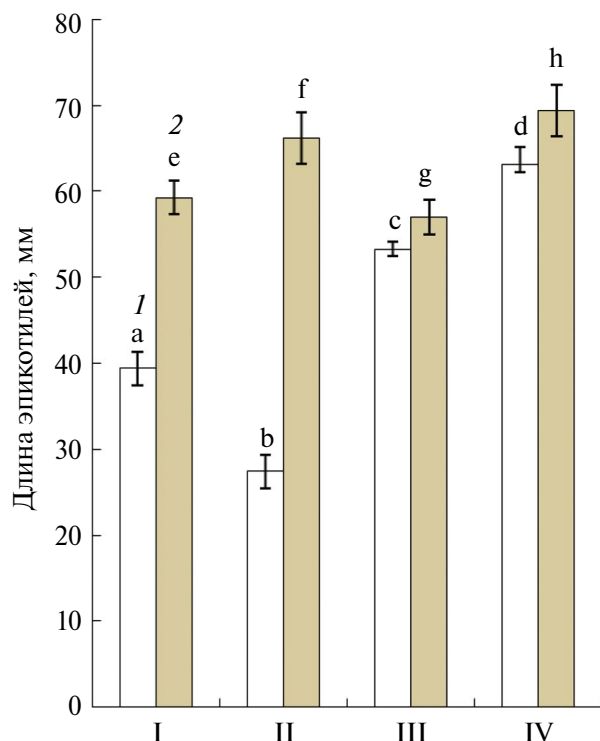


Рис. 5. Влияние обезвоживания и обработки мелатонином на длину эпикотилей 5-дневных проростков гороха, выросших из семян зародышей группы (I) и зародышей группы 2 (2). Варианты опытов: I – контрольные семена, II – семена после обработки мелатонином, III – семена после обезвоживания, IV – семена после обезвоживания и обработки мелатонином. На рисунках представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Статистически значимые различия между средними значениями определяли с помощью Tukey теста в программе ANOVA, результаты, отмеченные разными буквами, статистически значимы при $P \leq 0.05$.

Влияние предобработки мелатонином и обезвоживания семян на окислительную активность митохондрий, выделенных из эпикотилей 5-дневных проростков

Полученные результаты показали, что обезвоживание и предобработка семян гороха мелатонином по-разному отражались на окислении митохондриями малата и сукцината. Так, при окислении НАД-зависимого субстрата предобработка семян мелатонином в контрольном варианте увеличивала скорость поглощения кислорода митохондриями в состоянии 3 (V_3) более чем в 2 раза, преимущественно за счет увеличения активности ЦП ($V_{цит}$) (рис. 6а). Несколько иная картина наблюдалась при окислении митохондриями янтарной кислоты. Митохондрии, выделенные из эпикотилей 5-дневных контрольных проростков гороха, характеризовались высокой скоростью окисления сукцината в состоянии 3, которая была вдвое выше аналогичной скорости окисления малата. Предобра-

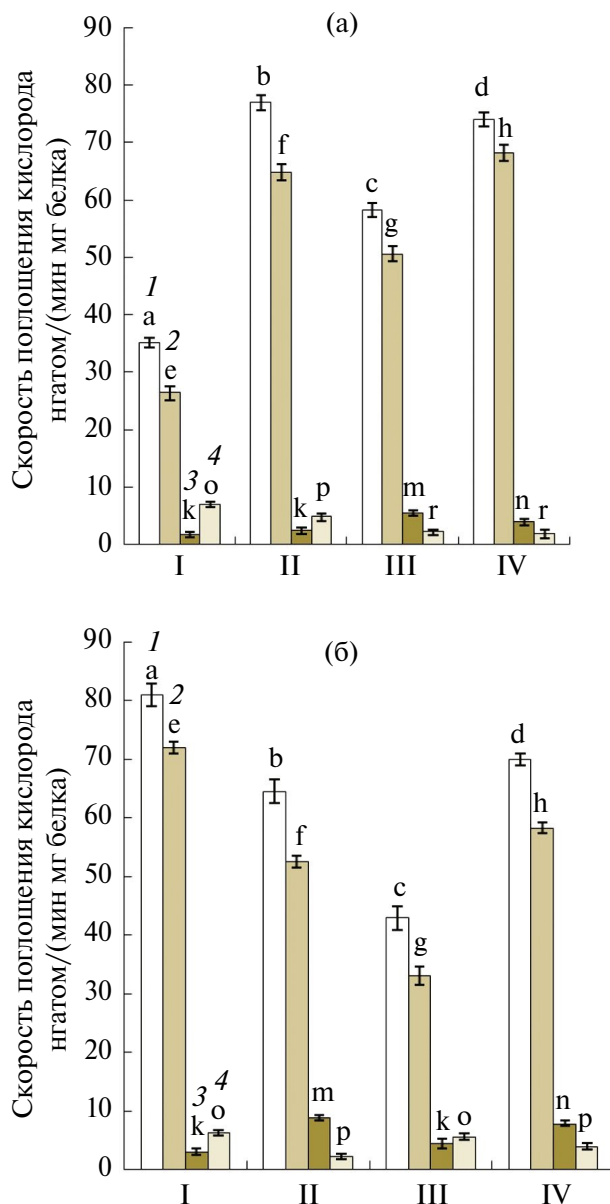


Рис. 6. Влияние обезвоживания и обработки мелатонином на дыхание и активность различных путей окисления малата (а) и сукцината (б) митохондриями эпикотилей 5-дневных проростков гороха: (1) – скорость окисления субстратов в состоянии 3 (V_3); (2) – скорость окисления субстратов по цитохромному пути ($V_{цит}$); (3) – скорость окисления субстратов по альтернативному пути ($V_{альт}$); (4) – скорость остаточного дыхания ($V_{ост}$). Варианты опытов: I – контрольные семена, II – семена после обработки мелатонином, III – семена после обезвоживания, IV – семена после обезвоживания и обработки мелатонином. На рисунках представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Статистически значимые различия между средними значениями опытных и контрольных образцов определяли с помощью Tukey теста в программе ANOVA, результаты, относящиеся к соответствующему субстрату (1 или 2), отмеченные разными буквами, статистически значимы при $P \leq 0.05$.

ботка семян мелатонином или не оказывала заметного влияния или незначительно снижала (максимально на 20–25%) скорость окисления этого субстрата митохондриями. В то же время, обезвоживание набухающих семян существенно (на 47%) тормозило V_3 при окислении сукцината в митохондриях эпикотилей. В этом варианте, предобработка семян мелатонином увеличивала скорость окисления сукцината митохондриями в состоянии 3 (на 63%) и активность ЦП (на 77%), т.е. поддерживала окисление этого субстрата ближе к уровню контроля (рис. 66). Таким образом, действие НФ (в данном случае обезвоживания), а также предобработки мелатонином, на набухающие семена гороха, существенным образом сказывалось не только на дыхании зародышей этих семян, но и на окислительной активности митохондрий, выделенных на более поздней стадии развития проростков.

ОБСУЖДЕНИЕ

Особенность набухающих семян состоит в том, что они переходят от сухого состояния к оводненному и этот процесс сопровождается восстановлением метаболизма, в первую очередь дыхательного, необходимого для поддержания энергопотребляющих процессов. Параллельно активируется рост зародышей и развитие проростков, что приводит к становлению растения. Отмечено, что набухающие зародыши проходят через определенные периоды — фазы развития, которые характеризуются изменениями в активности поглощения воды, направленности и интенсивности метаболизма, а также в содержании АФК и состоянии антиоксидантной системы [2, 26]. У *Pisum sativum* начало набухания семян сопровождалось немедленным, но быстро проходящим всплеском экстраклеточной редокс-активности, включающей повышение уровня супероксида и перекиси водорода в тканях [15]. На финальной стадии прорастания, параллельно с ростом зародыша и его выходом из оболочек семени, происходил второй подъем АФК — продуцировался супероксид, но не перекись водорода, а также активировалась экстраклеточная пероксидаза. Полученные нами результаты соответствуют данным о стимуляции метаболизма зародышей в период перехода от замкнутого состояния в семени к контакту с воздухом [15], и одновременно о подъеме уровня АФК в тканях зародышей [14]. Мы также показали, что в этот период возрастал уровень ПОЛ (тестируемый по образованию ТБК-РП) в контрольном варианте у зародышей группы 2, но не у более мелких зародышей группы 1, отстающих в своем развитии (рис. 2).

У более мелких зародышей обезвоживание не снижало уровень ТБК-РП, но и не повышало

его, как и не влияло на общую скорость дыхания ($V_{общ}$), т.е. они по этим показателям не реагировали на обезвоживание. При этом, мелкие зародыши, как и более продвинутые в развитии, возможно, сохранили защитные механизмы, позволяющие им благополучно продолжать рост в условиях обезвоживания. Например, стрессовые белки SHP22, или Lea — белки PsLEAm, которые накапливаются в матриксе митохондрий сухих семян, были обнаружены и у 72-дневных проростков бобовых [31, 32].

Полученные результаты показали также, что реакция дыхания зародышей на предобработку мелатонином у контрольных семян сводится к заметному повышению активности ЦП и некоторому подавлению активности АП у обеих групп зародышей. В результате скорость поглощения кислорода зародышами обеих групп возрастала. Кроме того, была обнаружена примерно одинаковая реакция зародышей обеих групп предобработанных мелатонином семян на обезвоживание — активность ЦП была в 1.6 (или 2 раза) выше у зародышей 2 группы и в 2.2 (или 1.5 раза) выше у более мелких зародышей группы 1 по сравнению с контролем и обезвоживанием соответственно (рис. 3, 4). Судя по этим данным, мелатонин поддерживал активность ЦП в условиях действия НФ даже у более продвинутых в развитии зародышей, у которых дыхание было дополнительно активировано вследствие контакта с кислородом воздуха.

Предобработка мелатонином во всех случаях снижала уровень ТБК-РП в ткани зародышей, но у более мелких снижение ТБК-РП в условиях обезвоживания было менее значительное, чем в контроле (рис. 2). Это подтверждает предположение об отсутствии кислородного стресса у зародышей в условиях обезвоживания семян. При этом надо иметь в виду, что увеличение водного дефицита зародышей за период 4-часового отсутствия влаги составляло 9–7%, это величина, на которую реагировало дыхание (в частности, заметным снижением общей скорости дыхания зародышей 2 группы), но окислительного стресса при этом не возникало.

Результаты наших исследований показали, что во время выхода зародышей из оболочек семени значительно стимулировалось дыхание, при этом скорость поглощения кислорода этими зародышами возрастала в 1.6 раза, активность ЦП увеличилась в 1.7 раза, а АП — в 1.4 раза (рис. 4). Судя по нашим данным, у более крупных зародышей группы 2 рост дыхательной активности в случае контакта с кислородом воздуха был нивелирован обезвоживанием, однако, у более мелких зародышей обезвоживание, напротив, стимулировало активность ЦП и АП. Противоположная реакция на обезвоживание является характерным

отличием зародышей двух исследуемых групп семян. Она свидетельствует, по-видимому, об их разном физиологическом состоянии: у более продвинутых в развитии семян обезвоживание тормозит отмеченное активирование метаболизма зародышей, которое может быть опасным в отсутствие достаточного водоснабжения. Это делает вторичную потерю воды семенами не столь опасной для метаболизма зародышей, а напротив, переводит семена в состояние, при котором они безопасно могли бы существовать в течение длительного периода. Снижение уровня ТБК-РП в зародышах в условиях обезвоживания подтверждает это предположение, которое, тем не менее, нуждается в дополнительном исследовании.

Сопоставляя дыхание митохондрий эпикотилей с дыханием отделенных зародышей видно, что окисление малата митохондриями более всего совпадает с соответствующей реакцией дыхания зародышей группы 1 на предобработку семян мелатонином и их обезвоживание. В частности, обработка гормоном существенно стимулировала дыхание зародышей и скорость поглощения кислорода при окислении малата митохондриями в состоянии 3, преимущественно за счет активации ЦП, как в контроле, так и при действии НФ (рис. 3, 6). Можно предположить, что по мере набухания и развития зародышей основными, наиболее активно окисляемыми субстратами в митохондриях мог быть именно малат и другие НАД-зависимые субстраты. Физиологически такой вывод обоснован, т.к. комплекс I энергетически наиболее эффективен, и он обеспечивает максимально возможное субстратное и энергетическое обеспечение развивающихся зародышей, например, зародышей кукурузы [6]. Sew с соавт. [33] пришли к выводу о важной роли малатдегидрогеназы на ранних фазах жизненного цикла *A. thaliana* в период прорастания семян и роста проростков. Это не противоречит тому факту, что на более позднем этапе развития проростков растений, включая проростки гороха, основным субстратом митохондриального окисления может стать уже другой субстрат — сукцинат, на окисление которого предобработка семян мелатонином сказывалась только после действия НФ (рис. 6б). Можно предположить, что у зародышей скорость окисления субстратов комплекса I митохондриями также активировалась предобработкой мелатонином и эффект был выше при обезвоживании. Однако эти предположения требуют экспериментальной проверки.

Возникает вопрос, как отражается воздействие предобработки мелатонином и непродолжительного обезвоживания семян на росте эпикотилей? Наши результаты показали,

что предобработка мелатонином достоверно стимулировала рост эпикотилей у семян группы 2, характеризующихся высокой всхожестью, причем в неблагоприятных условиях не менее эффективно, чем в контроле (рис. 5). Это свидетельствует о положительном влиянии предобработки 0.1 мкМ мелатонином семян гороха на рост и дыхательный метаболизм проростков.

Таким образом, полученные результаты подтвердили, что у зародышей гороха в период перехода от набухания в семени к контакту с кислородом воздуха значительно активируется дыхательный метаболизм, о чем свидетельствует стимуляция энергетически значимого цитохромного пути митохондриального окисления. Также мы подтвердили, что в это время повышается уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ), тестируемый по уровню ТБК-РП в тканях зародышей семян гороха. Полученные в работе результаты свидетельствуют о высокой чувствительности к 4-часовому обезвоживанию семян растущих проростков, а также об эффективности предобработки семян 0.1 мкМ мелатонином в поддержании роста и дыхательного метаболизма зародышей и проростков, как в нормальных условиях, так и в условиях неблагоприятного воздействия. Впервые показано, что обработка семян гороха мелатонином существенно стимулировала рост эпикотилей проростков, а также активировала окисление малата изолированными из них митохондриями, как в контрольных условиях, так и после кратковременного обезвоживания. Также впервые показано, что обезвоживание тканей зародыша может не сопровождаться окислительным стрессом.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках государственного задания (номер темы 121040800153-1 “Механизмы адаптации растений к факторам аридизации глобального климата и антропогенному загрязнению окружающей среды”).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aflaki F., Sedghi M., Pazuki A., Pessarakli M. Investigation of seed germination indices for early selection of salinity tolerant genotypes: A case study in wheat // Emirates J. Food and Agricult. 2017. V. 29. P. 222. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-12-1940>

2. Farooq M.A., Ma W., Shen S., Gu A. Underlying biochemical and molecular mechanisms for seed germination // IJMS. 2022. V. 23. P. 8502. <https://doi.org/10.3390/ijms23158502>
3. Czosnowski J. Metabolism of excised embryos of *Lupinus luteus* L. Effect of metabolic inhibitors and growth substances on the water uptake // Acta Soc. Bot. Pol. 1962. V. 31. P. 135.
4. Nawa Y., Asahi T. Rapid development of mitochondria in pea cotyledons during the early stage of germination // Plant Physiol. 1971. V. 48. P. 671. <https://doi.org/10.1104/pp.48.6.671>
5. Sato S., Asahi T. Biochemical properties of mitochondrial membrane from dry pea seeds and changes in properties during imbibition // Plant Physiol. 1975. V. 58. P. 816.
6. Logan D.C., Millar A.H., Sweetlove L.J., Hill S.A., Leaver C.J. Mitochondrial biogenesis during germination in maize embryos // Plant Physiol. 2001. V. 125. P. 662.
7. Nawa Y., Asahi T. Relationship between the water content of pea cotyledons and mitochondrial development during the early stage of germination // Plant Cell Physiol. 1973. V. 14. P. 607.
8. Raymond P., Al-Ani A., Pradet A. ATP production by respiration and fermentation, and energy charge during aerobiosis and anaerobiosis in twelve fatty and starchy germinating seeds // Plant Physiol. 1985. V. 79. P. 879.
9. Al-Ani A., Bruzau F., Raymond P., Saint-Ges V., Leblanc J.M., Pradet A. Germination, respiration, and adenylate energy charge of seeds at various oxygen partial pressures // Plant Physiol. 1985. V. 79. P. 885.
10. Hourmant A., Pradet A. Oxidative phosphorylation in germinating lettuce seeds (*Lactuca sativa*) during the first hours of imbibition // Plant Physiol. 1981. V. 68. P. 631. <https://doi.org/10.1104/pp.68.3.631>
11. Leprince O., van der Werf A., Deltour R., Lambers H. Respiratory pathways in germinating maize radicles correlated with desiccation tolerance and soluble sugars // Physiol. Plant. 1992. V. 85. P. 581.
12. Leprince O., Atherton N.M., Deltour R., Hendry C.A.F. The involvement of respiration in free radical processes during loss of desiccation tolerance in germinating *Zea mays* L. // Plant Physiol. 1994. V. 104. P. 1333.
13. Bailly C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology // Seed Sci. Res. 2004. V. 14. P. 93. <https://doi.org/10.1079/SSR2004159>
14. Bailly C. The signalling role of ROS in the regulation of seed germination and dormancy // Biochem. J. 2019. V. 476. P. 3019. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190159>
15. Kranner I., Roach T., Beckett R.P., Whitaker C., Minibayeva F.V. Extracellular production of reactive oxygen species during seed germination and early seedling growth in *Pisum sativum* // J. Plant Physiol. 2010. V. 167. P. 805. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.01.019>
16. Bai Y., Xiao S., Zhang Z., Zhang Y., Sun H., Zhang K., Wang X., Bai Z., Li C., Liu L. Melatonin improves the germination rate of cotton seeds under drought stress by opening pores in the seed coat // Peer J. 2020. 8:e9450. <https://doi.org/10.7717/peerj.9450>
17. Farooq M., Wahid A., Ahmad N., Asad S.A. Comparative efficacy of surface drying and re-drying seed priming in rice: changes in emergence, seedling growth and associated metabolic events // Paddy Water Environ. 2010. V. 8. P. 15. <https://doi.org/10.1007/s10333-009-0170-1>
18. Zhang N., Zhao B., Zhang H.J., Weeda S., Yang C., Yang Z.C., Ren S., Guo Y.D. Melatonin promotes water-stress tolerance, lateral root formation and seed germination in cucumber (*Cucumis sativus* L.) // J. Pineal Res. 2013. V. 54. P. 15. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2012.01015.x>
19. Liu J., Wang W., Wang L., Sun Y. Exogenous melatonin improves seedling health index and drought tolerance in tomato // Plant Growth Regul. 2015. V. 77. P. 317. <https://doi.org/10.1007/s10725-015-0066-6>
20. Hankl F., Çingi M., Akinkl H. Influence of l-tryptophan and melatonin on germination of onion and leek seeds at different temperatures // Turk. J. Agric. Res. 2019. V. 6. P. 214.
21. Hernandez I.G., Gomez F.V., Cerutti S., Arana M.V., Silva M.F. Melatonin in *Arabidopsis thaliana* acts as plant growth regulator at low concentrations and preserves seed viability at high concentrations // Plant Physiol. Biochem. 2015. V. 94. P. 191. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.06.011>
22. Lv Y., Pan J., Wang H., Reiter R.J., Li X., Mou Z., Zhang J., Yao Z., Zhao D., Yu D. Melatonin inhibits seed germination by crosstalk with abscisic acid, gibberellin, and auxin in *Arabidopsis* // J. Pineal Res. 2021. V. 70. P. 1. <https://doi.org/10.1111/jpi.12736>
23. Wang W.Q., Cheng H.-Y., Möller I.M., Song S.-Q. The role of recovery of mitochondrial structure and function in desiccation tolerance of pea seeds // Phys. Plant. 2012. V. 144. P. 20. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01518.x>
24. Zhigacheva I.V., Binyukov V.I., Generozova I.P., Mil E.M., Krikunova N.I., Rasulov M.M., Albantova A.A. Sodium 2-dithiosulphate-tetranitrosyl diferate tetrahydrate prevents heat shock-induced mitochondria dysfunction // Rus. J. Plant Physiol. 2022. V. 69. P. 198. <https://doi.org/10.1134/S1021443722010228>
25. Li Y., Wang Y., Xue H., Pritchard H.W., Wang X. Changes in the mitochondrial protein profile due to ROS eruption during ageing of elm (*Ulmus pumila* L.) seeds // Plant Physiol. Biochem. 2017. V. 114. P. 72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.02.023>
26. El-Maarouf-Bouteau H., Bailly C. Oxidative signaling in seed germination and dormancy // Plant Sign. Behav. 2008. V. 3. P. 175.

27. McDonald A.E., Sieger S.M., Vanlerberhe G.C. Methods and approaches to study plant mitochondrial oxidase // *Physiol. Plant.* 2002. V. 116. P. 135.
28. Generozova I.P., Vasilyev S.V., Butsanets P.A., Shugaev A.G. Combined action of melatonin and water deficiency on growth and MDA content of hypocotyls and roots of lupine and respiration of mitochondria isolated from these organs // *Russ J. Plant Physiol.* 2022. V. 69. P. 93.
<https://doi.org/10.1134/S1021443722050077>
29. Schmitt N., Dizengremel P. Effect of osmotic stress on mitochondria isolated from etiolated mung bean and sorghum seedlings // *Plant Physiol. Biochem.* 1989. V. 27. P. 1.
30. Hodges D.M., DeLong J.M., Forney C.F., Prange R.K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds // *Planta.* 1999. V. 207. P. 604.
31. Grelet J., Benamar A., Teyssier E., Avelang-Macherel M.H., Grunwald D., Macherel D. Identification in pea seed mitochondria of a late-embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying // *Plant Physiol.* 2005. V. 137. P. 157.
32. Tolleter D., Jaquinod M., Mangavel C., Passirani C., Saulnier P., Manon S., Teyssier E., Patet N., Avelang-Macherel M.-H., Macherel D. Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein are revealed by dessication // *Plant Cell.* 2007. V. 19. P. 1580.
33. Sew Y.S., Ströher E., Fenske R., Millar A.H. Loss of mitochondrial malate dehydrogenase activity alters seed metabolism impairing seed maturation and post-germination growth in Arabidopsis // *Plant Physiol.* 2016. V. 171. P. 849.
<https://doi.org/10.1104/pp.16.01654>