

## УСТОЙЧИВОСТЬ РЕКАЛЬЦИТРАНТНЫХ СЕМЯН К НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМУ СТРЕССУ: РОЛЬ LEA-БЕЛКОВ И ДЕГИДРИНОВ

М.И. Азаркович

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия, *m-azarkovich@ippras.ru*

**Аннотация.** Рекальцитрантные (неустойчивые к высыханию) семена древесных растений умеренного климата (каштан конский, дуб черешчатый) подвергаются в зимний период сильному холодовому стрессу. Наличие в клетках таких семян большого количества гидрофильных термостабильных белков (LEA-белков и дегидринов) может являться одним из способов адаптации рекальцитрантных семян к повреждающему действию холода.

**Ключевые слова:** рекальцитрантные семена, LEA-белки, дегидрины

**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-43-46

В отличие от ортодоксальных семян, созревание которых сопровождается генетически детерминированным высыханием, рекальцитрантные семена к моменту опадения сохраняют высокую влажность и активный метаболизм. Большинство видов растений, имеющих рекальцитрантные семена, произрастают в тропиках. Немногочисленные виды древесных растений умеренного климата с рекальцитрантными семенами (*Aesculus hippocastanum* L., *Quercus robur* L., виды *Acer*) вынуждены приспосабливаться к сезонному понижению температуры (зимним условиям). Например, семена каштана конского и дуба черешчатого выработали в процессе эволюции состояние глубокого покоя, при котором высокооводненные семена не способны прорасти. Высыхание ортодоксальных семян – тоже способ пережить неблагоприятные условия. Но как семена, имеющие высокую влажность, выживают под снежным покровом в зимний период?

В основе всех адаптивных процессов, происходящих в клетке, лежит синтез необходимых белков [Трунова, 2007]. Исследованиями последних лет установлено, что в ответ на низкотемпературный стресс в растениях синтезируются специфические стрессовые белки [Колесниченко, Войников, 2003]. Среди них – антифризные белки, предохраняющие клетки растений от повреждения кристаллами льда, молекулярные шапероны и дегидрины, предохраняющие макромолекулы при низкотемпературном стрессе, стрессовые белки, разобщающие окисление и фосфорилирование в митохондриях во время холодового шока. Одной из групп белков, гены которых экспрессируются при низкотемпературном стрессе, являются дегидрины, впервые идентифицированные в конце прошлого века в созревающих семенах. Дегидрины представляют собой сложное семейство гидрофильных термоустойчивых белков, относящихся к группе белков позднего эмбриогенеза. Белки позднего эмбриогенеза, или LEA-белки (Late Embryogenesis Abundant) широко исследуются в последнее время, однако их функции все еще до конца не выяснены [Battaglia et al., 2008]. Они индуцируются в ответ на дегидратацию клеток, возникающую при засухе, солевом стрессе, холодовой акклиматизации, при обработке некоторыми фитогормонами (АБК – основной гормон, накапливающийся в периоды наибольшего повышения морозоустойчивости растений) и в процессе созревания ортодоксальных семян, заключительные этапы развития которых происходят на фоне генетически детерминированного обезвоживания. Предполагаемая функция дегидринов состоит в изменении термодинамики взаимодействия макромолекул с водой и обеспечении тем самым стабильности молекул белков и нуклеиновых кислот путем предотвращения их

денатурации при обезвоживании [Аллагулова и др., 2003; Rorat, 2006; Chakrabortee et al., 2007]. LEA-белки и дегидрины широко распространены в растительном мире. Они идентифицированы в тканях голо- и покрытосеменных растений, практически во всех зимующих древесных и травянистых видах, в вегетативных органах и семенах, найдены в последнее время в водорослях, цианобактериях, грибах, микроорганизмах, и даже в клетках животных (простейших, нематод, насекомых), где им также приписывают функции стабилизации белковых макромолекул [Chakrabortee et al., 2007]. Накопление дегидринов в ответ на холодовое воздействие отмечено у растений пшеницы [Шакирова и др., 2009; Репкина и др., 2017; Kosová et al., 2014], ячменя [Kosová et al., 2014], в митохондриях проростков гороха [Кондакова и др., 2013].

Семена представляют особый интерес для исследования свойств и функций этой группы белков. В ортодоксальных семенах дегидрины, как и другие термостабильные LEA-белки, накапливаются при созревании, которое сопровождается высыханием семян без потери их жизнеспособности, и это коррелирует с выработкой устойчивости к дегидратации, а при прорастании дегидрины исчезают, и это совпадает с утратой устойчивости к дегидратации. В отличие от этого, рекальцитрантные семена в зрелом состоянии сохраняют высокую влажность и при искусственном высушивании теряют жизнеспособность. Было высказано предположение, что отсутствие устойчивости к дегидратации у рекальцитрантных семян может быть следствием отсутствия в них дегидринов. Действительно, в одной из первых работ, выполненных на рекальцитрантных семенах, было показано, что в них отсутствуют термостабильные LEA-белки, частью которых являются дегидрины. Однако в дальнейшем дегидрины были идентифицированы в осях и семядолях ряда рекальцитрантных семян древесных растений [Farrant et al., 1996; Гумилевская, Азаркович, 2010; Kalemba, Pukacka, 2012].

Анализ белков семян каштана конского (*Aesculus hippocastanum* L.) позволил выявить ряд уникальных особенностей их белкового комплекса, которые отличают рекальцитрантные семена каштана от большинства ортодоксальных семян и, по-видимому, могут иметь отношение к особенностям физиологического поведения исследуемых семян [Азаркович, Гумилевская, 2006; Гумилевская, Азаркович, 2007]. К этим особенностям можно отнести чрезвычайно низкое содержание глобулинов, преобладание водорастворимых белков, локализованных в цитоплазме и высокий уровень фракции некомпартментализованных термостабильных белков (до 30% от белков цитозоля в зародышевых осях и около 80% в семядолях). Исследование белковых спектров осей и семядолей семян каштана не выявило во фракции клеточных структур мажорных компонентов, которые могли бы претендовать на роль запасных белков. С помощью световой микроскопии и специфического окрашивания белка и фитина также не удалось выявить типичных белковых тел в вакуолях клеток осей и семядолей [Азаркович, Болякина, 2016].

Для еще одного вида средней полосы России, имеющего рекальцитрантные семена – дуба черешчатого (*Quercus robur* L.), были обнаружены сходные особенности ультраструктуры и фракционного состава белков [Азаркович, Назаренко, 2014].

Таким образом, предположение о том, что неустойчивость рекальцитрантных семян к высыханию обусловлена отсутствием в них дегидринов, не нашло подтверждения. Очевидно, что рекальцитрантные семена обладают генами дегидринов и способны продуцировать дегидрины, но при этом остаются чувствительными к потере воды. Однако нельзя исключить возможности того, что отсутствие или недостаточное содержание какого-то одного из дегидринов может повлечь за собой неспособность рекальцитрантных семян противостоять высыханию, поскольку функции отдельных дегидринов пока остаются неизвестными. В связи с этим весьма актуальным становится вопрос о роли дегидринов в рекальцитрантных семенах.

Известно, что низкие температуры и обезвоживание вызывают сходные повреждения в вегетативных тканях растений и индуцируют экспрессию дегидриновых генов. Вполне вероятно, что накопление дегидринов способствует выработке устойчивости или толерантности не только к осмотическому, но и низкотемпературному стрессу [Шакирова и др., 2009; Репкина и др., 2017; Borovskii et al., 2002; Close, 1997; Kosova et al., 2014]. По всей видимости, дегидрины в рекальцитрантных семенах обеспечивают защиту клеточных структур от повреждений, вызванных низкотемпературным стрессом. Известно, что АБК связана с преодолением растением внешних стрессов и индуцирует накопление дегидринов. В исследованных рекальцитрантных семенах с низким содержанием АБК (ниже 50 нг/г) дегидрины отсутствовали, но в семенах с высоким содержанием АБК дегидрины были идентифицированы [Farrant et al., 1996]. Таким образом, имеющиеся в настоящее время весьма ограниченные данные говорят о том, что в рекальцитрантных семенах дегидрины появляются в ответ на низкотемпературный стресс, на повышение содержания АБК и на естественную или искусственную ограниченную дегидратацию [Azarkovich, 2016].

Экспрессия генов LEA-белков показана не только в созревающих семенах, но и во многих других растительных (и животных) тканях, что указывает на их древность, но в то же время необходимость для видов, в которых они поддерживаются на протяжении эволюции. В настоящее время LEA-белкам (и дегидринам) приписывают универсальную осмопротекторную функцию. Дегидрины синтезируются в ответ на дегидратацию клеток, возникающую при засухе, солевом стрессе, холодной акклиматизации, при обработке некоторыми фитогормонами (АБК) и в процессе созревания семян.

Можно предположить, что в рекальцитрантных семенах видов умеренного климата именно гидрофильные термостабильные LEA-белки не только предохраняют клеточные структуры семени от существенной потери влаги (что является для рекальцитрантных семян смертельным), но и обеспечивают устойчивость высокооводненных семян к длительному холодovому стрессу. При этом для приобретения и поддержания устойчивости к высыханию, которая характерна для ортодоксальных семян, только наличия LEA-белков, по-видимому, недостаточно.

*Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ и Программы «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН.*

#### Литература

Азаркович М.И., Болякина Ю.П. В рекальцитрантных семенах каштана конского нет белковых тел. // Физиология растений. – 2016. – Т. 63. – С. 532–538.

Азаркович М.И., Гумилевская Н.А. Анализ белков семядолей зрелых семян конского каштана // Физиология растений. – 2006. – Т. 53. – С. 711–720.

Азаркович М.И., Назаренко Л.В. Существуют ли алейроновые зерна в рекальцитрантных семенах дуба черешчатого? // Вестник Московского городского педагогического университета. Сер. «Естественные науки». – 2014. – № 4. – С. 39–45.

Аллагулова Ч.Р., Гималов Ф.Р., Шакирова Ф.М., Вахитов В.А. Дегидрины растений: их структура и предполагаемые функции // Биохимия. – 2003. – Т. 68. – С. 1157–1165.

Гумилевская Н.А., Азаркович М.И. Физиолого-биохимическая характеристика рекальцитрантных семян (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 43, № 3. – С. 366–375.

Гумилевская Н.А., Азаркович М.И. Идентификация и характеристика дегидринов в рекальцитрантных семенах конского каштана // Физиология растений. – 2010. – Т. 57. – С. 918–924.

Колесниченко А.В., Войников В.К. Белки низкотемпературного стресса растений. – Иркутск: СО РАН, 2003. – 196 с.

Кондакова М.А., Уколова И.В., Войников В.К., Боровский Г.Б. Ассоциация дегидринов проростков гороха с суперкомплексами дыхательной цепи митохондрий в период гипотермии // *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. –2013. –V. 9. –P. 279–288.

Репкина Н.С., Титов А.Ф., Таланова В.В. Влияние низкой температуры и кадмия на экспрессию гена дегидрина WCS120 в листьях пшеницы // *Труды КарНЦ РАН. Сер. Экспериментальная биология*. –2016. –№ 6. –С. 65–73.

Трунова Т.И. Растение и низкотемпературный стресс. – М.: Наука, 2007. – 54 с.

Шакирова Ф.М., Аллагулова Ч.Р., Безрукова М.В., Авальбаев А.М., Гималов Ф.Р. Роль эндогенной АБК в индуцируемой холодом экспрессии *TADHN* гена дегидрина в проростках пшеницы // *Физиология растений*. –2009.– Т. 56, № 5. – С. 796–800.

Azarkovich M.I. Stress-induced proteins in recalcitrant seeds during deep dormancy and early germination. In: *Abiotic and Biotic Stress in Plants – Recent Advances and Future Perspectives* (Eds. Shanker A.K., Shanker Ch.). – INTECH, – 2016. – Chapter 13. – P. 317–336.

Battaglia M., Olvera-Carrillo Y., Garcarrubio A., Campos F., Covarrubias A.A. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins // *Plant Physiol.* – 2008. – V. 148. – P. 6–24.

Borovskii G.B., Stupnikova I.V., Antipina A.I., Vladimirova S.V., Voinikov V.K. Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment // *BMC Plant Biol.* – 2002. – V. 2. – P. 5–11.

Chakrabortee S., Boschetti C., Walton L.J., Sarkar S., Rubinsztein D.C., Tunnacliffe A. Hydrophilic protein associated with desiccation tolerance exhibits broad protein stabilization function // *PNAS*. – 2007. – V. 104. – P. 18073–18078.

Close T.J. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature // *Physiol. Plantarum*. – 1997. –V. 100. – P. 291–296.

Farrant J.M., Pammenter N.W., Berjak P., Farnsworth E.J., Vertucci C.W. Presence of dehydrin-like proteins and level of abscisic acid in recalcitrant (desiccation sensitive) seeds may be related to habitat // *Seed Sci. Res.* –1996. – V. 6. – P. 175–182.

Kalemba E.M., Pukacka S. Association of protective proteins with dehydration and desiccation of orthodox and recalcitrant category seeds of three *Acer* genus species.// *J. Plant Growth Regul.* – 2012. – V. 31. – P. 351–362.

Kosová K., Vitámvás P., Prášil I.T. Wheat and barley dehydrins under cold, drought and salinity – what can LEA-II proteins tell us about plant stress response? // *Frontiers in Plant Science*. – 2014. – V. 5. – Article 343:1–6.

Rorat T. Plant dehydrins – tissue location, structure and function. // *Cell Mol. Biol. Lett.* – 2006. – V. 11. – P. 536–556.

## **COLD STRESS TOLERANCE OF RECALCITRANT SEEDS: THE ROLE OF LEA-PROTEINS AND DEHYDRINS**

M.I. Azarkovich

K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia, *m-azarkovich@ippras.ru*

**Abstract.** Recalcitrant seeds are shed from parent plant at high moisture content; seeds are desiccation intolerant. Seeds from trees of temperate zone have deep dormancy to withstand the forthcoming winter. Proteins in recalcitrant *Aesculus hippocastanum* L. and *Quercus robur* L. seeds contain extremely low content of globulins, and high level of non-compartmentalized heat-stable proteins (LEA-proteins and dehydrins). The presence of a great amount of hydrophilic proteins capable of holding water is related to the recalcitrancy of seeds. It might be as well that these proteins could improve seed tolerance to long-term action of low temperature in spite of their high hydration and thus maintain embryo vitality under conditions of cold stratification or snow in winter.

**Keywords:** *recalcitrant seeds, LEA-proteins, dehydrins*