

На правах рукописи

Литягина

Литягина Снежана Владимировна

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
РЕКАЛЬЦИТРАНТНОСТИ СЕМЯН НА ПРИМЕРЕ
КОНСКОГО КАШТАНА**

03.01.05. – Физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2010

Работа выполнена в лаборатории сигнальных систем контроля онтогенеза им. акад. М.Х. Чайлахяна Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
академик РАЕН

Обручева Наталья Владимировна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор

Балнокин Юрий Владимирович

доктор биологических наук

Веселова Татьяна Владимировна

Ведущая организация:

РГАУ – МСХА им. К.А. Тимирязева

Защита диссертации состоится «23» ноября 2010 г. в «11» часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Учреждении Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35. Факс (499) 9778018, e-mail: ifr@ippras.ru; m-azarkovich@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Автореферат разослан 22 октября 2010 г.

Ученый секретарь
совета по защите докторских
и кандидатских диссертаций,
кандидат биологических наук



М.И. Азаркович

Актуальность проблемы. Понятие «рекальцитрантность» (в переводе «непослушность») стало использоваться с 1980 г., в отношении зрелых семян, которые гибнут при высыхании, в отличие от обычных, устойчивых к высыханию, так называемых ортодоксальных семян. Уже в период созревания оба типа семян заметно различаются по водному статусу. Во время созревания и те, и другие постепенно теряют воду, при этом ортодоксальные семена в конце периода созревания, высыхают до влажности около 10%; в таком состоянии они могут храниться многие годы, сохраняя жизнеспособность. Такое свойство ортодоксальных семян получило название «устойчивость к высыханию». В отличие от них, потеря воды рекальцитрантными семенами приводит к потере всхожести и гибели - поэтому их считают чувствительными к высыханию.

Изучение физиологии рекальцитрантных семян до сих пор было сосредоточено на природе их чувствительности к высыханию (Farmsworth, 2000; Walters, 2000; Berjak, Pammenter, 2007), т.е. на их принципиальном отличии от ортодоксальных семян. Установлено, что причиной их гибели при высыхании является недостаточная активность антиоксидантной защиты (Roach et al., 2008, 2010), приводящая к накоплению активных форм кислорода в токсичных концентрациях. Однако практически никем не изучалась сама физиология рекальцитрантности, связанная, в первую очередь, с поддержанием высокой оводненности и жизнеспособности.

Рекальцитрантность семян больше всего распространена в районах с умеренно-влажным тропическим климатом, особенно в так называемых дождевых лесах. Там зрелые семена сразу падают во влажную почву и не испытывают недостатка влаги, что позволяет им тут же прорасти. По этой причине они не обладают устойчивостью к высыханию. Их рекальцитрантность позволяет им успешно сократить период времени между созреванием и прорастанием, что способствует быстрому возобновлению вида. Рекальцитрантные семена характерны также и для растений субтропиков, а также для местообитаний с сезонными изменениями климата, с высокой влажностью в период созревания и прорастания семян (Tweedle et al., 2003).

Объектом данного исследования были выбраны рекальцитрантные семена конского каштана *Aesculus hippocastanum*. Они представляют собой крайний случай рекальцитрантности, потому что, в отличие от типичных тропических и субтропических видов семян, в зимних условиях средней России они вынуждены уходить в покой, сохраняя рекальцитрантность длительное время. В связи с этим, изучение именно семян каштана, проявляющих пролонгированную рекальцитрантность, позволит установить какие процессы лежат в ее основе.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы было изучить физиологические особенности, обуславливающие рекальцитрантность семян конского каштана *Aesculus hippocastanum*.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. охарактеризовать состояние покоя, выхода из покоя и прорастание семян конского каштана в связи с водным статусом;
2. изучить состояние вакуолей и их физиологическую активность в осевых органах;
3. исследовать состав и динамику углеводов в осевых органах в связи с подготовкой семян к прорастанию.

Научная новизна. В данной работе впервые физиология рекальцитрантных семян изучена с позиций водного режима и его особенностей в осевых органах. Впервые успешно продемонстрирована роль сохранения вакуолей в период от опадения до прорастания семян, и показано, что вакуоли сохраняют интактную мембрану (на примере H^+ -АТФазы) и ферментный аппарат (на примере кислой вакуолярной инвертазы) и способны функционировать в рекальцитрантных семенах. Совершенно новым является обнаруженный нами факт, что у рекальцитрантных семян происходит ранний, в начале набухания, приток сахарозы из семядолей в осевые органы. Показано, что он сопровождается усилением активности вакуолярной инвертазы и инвертазы клеточной стенки и приводит к резкому возрастанию содержания моносахаров, которое в свою очередь обеспечивает повышение концентрации осмотиков в клетках осевых органов, инициацию растяжения клеток и быстрое прорастание семян.

Теоретическая и практическая значимость работы. Изученные биологические особенности рекальцитрантных семян конского каштана позволяют обосновать режим хранения таких семян для успешной интродукции этого вида. Теоретические обобщения и совокупность полученных экспериментальных данных могут быть включены в курсы лекций по физиологии растений на биологических факультетах университетов и в лесотехнических институтах.

Апробация работы. Основные результаты были представлены на Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2003, 2008, 2009», V Международной научной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений» (Минск, 2007), на VI Международной научной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений» (Минск, 2009), годовом собрании ОФР «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений» Екатеринбург, 2008.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 работ, из них 2 в иностранной печати, и 3 в журналах, рекомендуемых ВАК.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из обзора литературы, описания объектов и методов исследований, изложения полученных результатов, их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 116 страницах машинописного текста, включает 7 таблиц, 28 рисунков; библиография содержит 103 источника, в том числе 81 на иностранных языках.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта были изучены рекальцитрантные семена конского каштана (*Aesculus hippocastanum* L.) – растения, из семейства Hippocastanaceae. Характерной особенностью прорастания семян каштана является рост только за счет растяжения клеток гипокотилия (Obroucheva, Antipova, 2003) до длины проростка 2.5-3.0 см.

Зрелые опавшие семена собирали в Главном ботаническом саду им. Н.В. Цицина РАН (г. Москва) в начале октября 2001-2008 гг. Свежесобранные семена каштана подвергали стратификации в ящиках с влажным песком в холодной камере при + 4°C в темноте. В данных условиях стратификация длится 17-18 недель, после чего семена дружно прорастали в ящиках. По ходу стратификации для оценки скорости прорастания отбирали пробы семян с неповрежденной семенной кожурой, стерилизовали в течение 5 мин 2%-ным раствором гипохлорита кальция, а затем промывали проточной холодной водой 1 час. Затем семена проращивали в темноте в термостате при 27°C на фильтровальной бумаге в небольшом количестве воды в накрытых стеклом эмалированных кюветах. Семена, у которых кончик корня прорвал семенную кожуру и появился на поверхности семени, считали проклюнувшимися.

Поскольку проклевание семян растянуто во времени, для оценки темпа прорастания был использован такой критерий, как наклевывание 50% семян. Поэтому по ходу стратификации неделю за неделей отмечали время наклевывания 50% семян из пробы. В каждый срок ставили опыты в трех повторностях по 30 семян в каждой.

В ряде экспериментов использовали не интактные семена, а семена, у которых удаляли кусочек кожуры над зародышевой осью для облегчения проникновения воды или растворов внутрь (семена с «окошечком»). В таком случае наклюнувшимся считалось семя, у которого зародышевая ось достигала 1.0 см, поскольку наклюнувшиеся интактные семена имели осевые органы такого же размера.

Для регистрации роста зародышевой оси из семян каштана периодически по ходу стратификации извлекали зародышевые оси (корень + гипокотиль + эпикотиль). Их помещали в чашки Петри диаметром 5 см на фильтровальную бумагу в 5 мл бидистиллята с добавлением хлорамфеникола (50 мкг/мл) для поддержания стерильности и выращивали при 27°C в темноте. Каждые 24 часа измеряли размер и сырой вес изолированных осей. Наклюнувшимся считали те зародышевые оси (осевые органы), сырой вес которых составлял 100 мг (по аналогии с осевыми органами из наклюнувшихся целых семян).

В экспериментах с ингибиторами по такой же схеме были использованы растворы циклогексимида (30 мкг/мл) и α -аманитина (5 мкг/мл).

Влажность осевых органов семян определяли после высушивания в бюксах в сушильном шкафу 1 час при 100°C, затем при 80°C в течение 2-3 сут., и рассчитывали в процентах на сырой вес.

Для биохимических анализов материал фиксировали при -20°C и хранили при -70°C.

Для определения активности вакуолярной инвертазы пробы растирали на холоду в 0.1M Na⁺-K⁺ фосфатном буфере для экстракции (pH 6.47) и центрифугировали при 13000g (Krishnan et al., 1985). После 3-кратного центрифугирования (13000g) супернатант подвергали диализу против того же фосфатного буфера для удаления свободных сахаров. Инкубацию пробы с субстратом проводили 0.1M фосфатно-цитратном буфере (pH 5.5) По окончании инкубации определяли активность инвертазы по количеству фруктозы, используя реакцию с резорцином, и измеряя интенсивность окрашивания при 520 нм. Результаты рассчитали на количество белка и представили как среднее арифметическое из трех повторностей и его стандартная ошибка.

Для определения активности инвертазы клеточной стенки осадок после центрифугирования (13000 g) обрабатывали 1M NaCl для высвобождения фермента, затем центрифугировали (13000 g), и диализовали супернатант против 0.1M фосфатного буфера (pH 6.47) для удаления соли. Инкубацию пробы с субстратом проводили в 0.1M фосфатно-цитратном буфере (pH 4.5) и определяли активность инвертазы, как указано выше (Krishnan et al., 1985).

Для определения углеводов в осевых органах размельченный сухой материал экстрагировали смесью метанол : хлороформ : вода (12:5:3) в течение 30 мин при 60°C в присутствии внутреннего стандарта (фенил-β-D-глюкопиранозида). После центрифугирования при 20000 g супернатанты объединяли и деионизировали, пропуская через ионно-обменные смолы (Dowex 50-10 mesh, 50Wx8 H⁺ и Dowex 1x8 Cl⁻, Fluka, Швейцария). Аликвоты переносили в ампулы из пластика для силилирования (Supelco Inc., США) и высушивали в токе азота. Для получения триметилсилил-производных, т.е. для замещения активных атомов водорода группой Si(CH₃), сухой остаток растворяли в безводном пиридине и обрабатывали смесью N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамида с катализатором триметилхлорсиланом (40:9:1) в течение часа при 75°C. После охлаждения 1 мкл смеси силилированных углеводов в растворенном состоянии вводили в газовый хроматограф HP 5890, серии II (Hewlett Packard, Австрия). Пробу разделяли в колонке HP1 из кварцевого стекла с жидкой фазой (полидиметилсилоксаном). Колонка имела длину 15 м, внутренний диаметр 0.53 мм и толщину слоя неподвижной фазы 0.15 мкм. Температуру повышали от 85° до 220°C со скоростью 10°C/мин, затем до 325°C со скоростью 12°C/мин и поддерживали при 325°C в течение 15 мин. Газ-носитель - гелий, скорость потока 2.5 мл/мин. Далее проба поступала в пламенно-ионизационный детектор (Hewlett Packard, Австрия) для сжигания в пламени водорода при 330°C. Углеводы идентифицировали по соответствующим триметилсилилированным стандартам и оценивали количественно с помощью интегратора Hewlett Packard 3396 по соотношению площадей полученных пиков и стандартов.

Содержание белка определяли с бицинхоиновым реагентом («Bicinchoninic acid protein assay kit», Sigma, США). В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин. Аликвоты образца для определения белка осаждали 80% ацетоном при -20°C, 1 час, затем центрифугировали 10 мин при 12000g, осадок белка растворяли в 200мкл 2%

додецилсульфата натрия (ДДС-Na). Затем к полученному раствору белка добавляли раствор – бисцинхониновая кислота : CuSO₄ (50:1), инкубировали при 37 °С 30 мин, оптическую плотность измеряли при 562 нм на спектрофотометре Genesys 10 uv (Thermo, США).

Для приготовления препарата белка для электрофореза использовали буфер, содержащий 0.0625 М буфер Трис-НСl (рН 6.8), 10% додецилсульфат-Na, 20% глицерин, 5% β-меркаптоэтанол и 0.02% бромфеноловый синий. Денатурацию белков проводили в течение 5 мин при 95°С на водяной бане.

Для электрофореза белков использовали прибор Midget Electrophoresis Unit 2050 (LKB, Швеция) с гелевыми пластинами 10см×8см×0.75мм. Электрофорез белков проводили в полиакриламидном геле в присутствии 1% додецилсульфата Na по методу Laemmli (1970). Использовали гелевые пластины с линейным градиентом концентрации акриламида 7.5-15% при рН 8.8 в разделяющем геле и 5% акриламида при рН 6.8 в концентрирующем геле. В качестве маркеров использовали набор белков (10-225 кД фирмы “Promega”, США). Электрофорез проводили при постоянной силе тока 15 мА в концентрирующем геле, а затем после входа белков в разделяющий гель устанавливали силу тока 20 мА, электрофорез шел в течение 1.5 ч. при 4-6° С.

Электрофоретическое разделение белков в отсутствие додецилсульфата Na в полиакриламидном геле (нативный электрофорез) проводили по методу Орнстейн-Дэвис. Для концентрирования белков во время электрофореза использовали гель с 4% полиакриламидом при рН 6.8, для разделения белков применяли гели с 7% полиакриламидом при рН 8.9. Для концентрирования белков в геле устанавливали силу тока 15 мА, электрофорез в разделяющем геле проводили при силе тока 20 мА в течение 2.5 ч. После нативного электрофореза гель помещали в чашки Петри в 0.1М фосфатно-цитратный буфер (рН 5.5) на 10 мин при 37°С в темноте. Затем в новой порции того же буфера с 0.6 М сахарозой гель оставляли в темноте на час при 37°С для проявления белком инвертазной активности и останавливали реакцию кипящим 4% NaOH, содержащим 0.2% 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид. В течение 10 мин развивалось устойчивое розово-красное окрашивание от образовавшейся фруктозы, позволявшее судить о локализации в геле инвертазного белка. Для извлечения из геля вырезали окрашенный участок и использовали его для приготовления препарата белка для денатурирующего электрофореза.

Для получения фракции микросомальных мембран навеску 2 г осевых органов семян каштана гомогенизировали при 4°С в 10 мл среды, содержащей 300 мМ сахарозы, 100 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 10 мМ ЭДТА, 5 мМ метабисульфит калия, 5 мМ дитиотреитол, 5 мМ фенолметилсульфонилфторид и 0.6%-ный поливинилпирролидон. Гомогенат фильтровали и центрифугировали при 10000 g. Супернатант затем центрифугировали при 100000 g в течение 60 мин. Суспензию микросомальных мембран замораживали и хранили при -70°С.

Для вестерн-блот анализа при идентификации вакуолярной H^+ -АТФазы белки после электрофореза переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Sigma, США) полусухим способом в течение 2 ч, используя Multiphor Electrophoresis Unit (“LKB”, Швеция). Затем мембрану отмывали 10 мМ фосфатным буфером (рН 7.4), содержащим 2.7 мМ KCl, 137 мМ NaCl, 0.05%-ный Твин-20 (PBS-T), и блокировали 1%-ным раствором желатина в PBS-T. Мембрану инкубировали в течение 2 ч при 37°C с иммунной сывороткой, содержащей кроличьи антитела против E-субъединицы вакуолярной H^+ -АТФазы (Agrisera, Швеция). Потом мембрану отмывали PBS-T от первичных антител и инкубировали в течение 2 ч со вторичными козьими антикроличьими антителами (разведение 1:2000), конъюгированными с пероксидазой хрена (“Promega”, США) в PBS-T. Мембрану далее отмывали в PBS-T. Фермент визуализировали, используя цветную реакцию на пероксидазу в растворе, содержащем 26 мг 4-хлор-1-нафтола, 7 мл метанола, 45 мл H_2O и 40 мкл 20 % H_2O_2 (Каравайко и др., 1995).

Для прижизненного окрашивания микроскопических препаратов делали продольные срезы осевых органов конского каштана (толщина 60 мкм) на вибрационном микротоме (HM 650V Zeiss). Для выявления вакуолей в живых клетках срезы окрашивали нейтральным красным (0.1 мг/л) (Барыкина и др., 2004). Срезы просматривали на универсальном микроскопе для проходящего и отраженного света (Axio Imager D1 Zeiss, Германия).

Для электронной микроскопии, проведенной при участии к.б.н. Ю.П. Болякиной, материал фиксировали по стандартной методике глутаральдегидом и дофиксировали четырехокисью осмия. Промытый материал обезвоживали в восходящей серии спиртов и заключали в смолу LRWhite. Срезы, полученные на ультрамикротоме, контрастировали уранилацетатом и просматривали под электронным микроскопом JEM 100B (Япония).

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы T-TEST. Для построения графиков использовали программы SigmaPlot и Microsoft Excel. Данные представлены в виде среднего арифметического и его стандартных ошибок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Характеристика покоя, выхода из покоя и прорастания семян в связи с их водным статусом.

Оводненность зрелых семян каштана при опадении достаточно высока и составляет у осевых органов 63-65% от сырого веса, у семядолей – 48-50%. В дальнейшем, в течение периода холодной стратификации (17 недель во влажном песке) влажность осевых органов семян каштана не меняется и поддерживается на этом же уровне (63-65%) (таблица 1).

Таблица 1. Влажность осевых органов в покоящихся и наклюнувшихся семенах конского каштана.

Длительность стратификации, нед.	Влажность осевых органов, % от сырого веса	Длительность стратификации, нед.	Влажность осевых органов, % от сырого веса
0	63.6 ± 0.9	10	63.6 ± 0.5
1	63.5 ± 0.8	11	63.6 ± 0.5
2	65.8 ± 0.4	12	64.7 ± 0.3
3	65.2 ± 0.1	13	64.5 ± 0.6
6	64.2 ± 0.5	15	64.0 ± 0.3
7	63.4 ± 0.4	17	65.7 ± 0.5
9	63.4 ± 0.2	Наклюнувшиеся семена	75.4 ± 0.5

Таким образом, рекальцитрантность семян каштана проявляется в их способности длительное время поддерживать высокую оводненность в осевых органах.

Зрелые свежесобранные семена каштана находятся в состоянии глубокого физиологического покоя, они не могут прорасти даже в условиях оптимальной температуры и достаточного водоснабжения. Для выведения семян каштана из покоя необходима длительная влажная стратификация, по мере увеличения срока которой они постепенно выходят из покоя, и способны наклеиваться как при благоприятных условиях, так и непосредственно в условиях стратификации (в холодной камере при 4° С).

Самым глубоким покоем обладают свежесобранные семена. О выходе семян из покоя можно судить по скорости наклеивания в оптимальных условиях (+27°С и достаточное водоснабжение) и по количеству наклюнувшихся в выборке семян на разных сроках стратификации. В наших экспериментах эти показатели фиксировались каждую неделю, что позволило судить о физиологическом состоянии семян на протяжении всего периода стратификации (рис. 1).

Опавшие семена (0 недель стратификации) и семена, подвергшиеся 1-6 недельной холодной стратификации, прорастали в оптимальных условиях очень медленно. Как видно из рис. 1, свежесобравшим семенам было необходимо 26-28 суток для прорастания 50% семян. Постепенно, с увеличением срока стратификации, способность семян к прорастанию усиливалась: сокращалось время наклеивания и увеличивался % наклюнувшихся семян. Семенам после 4 недель стратификации требовалось 14-16 суток для прорастания 50 % семян, семенам после 12 недель стратификации – 6-8 суток, семенам после 16 недель стратификации – 2 суток. Способность к быстрому прорастанию (1-2 суток) приобретали 95-97% семян. Таким образом, семена переходят из состояния глубокого покоя к выходу из покоя, который завершается полным отсутствием покоя и быстрым прорастанием, причем синхронность прорастания возрастает.

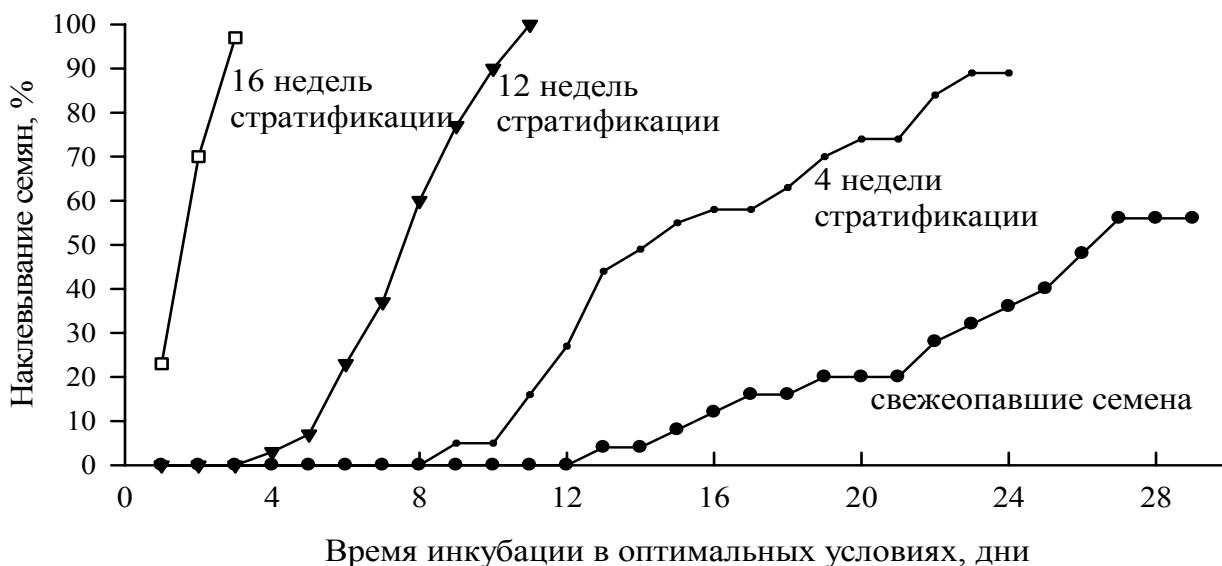


Рис. 1. Динамика прорастания целых семян конского каштана после различных сроков холодной влажной стратификации.

Известно, что для ортодоксальных семян характерны две причины покоя – покой самого зародыша и покой, обусловленный кожурой. Мы изучили эти показатели у рекальцитрантных семян каштана.

Семена, у которых над осевыми органами была удалена семенная кожура, «с окошечком», прорастают заметно быстрее (рис. 2А). Для свежеепавших семян с частично удаленной семенной кожурой необходимо 6 суток для прорастания 50% семян, в то время как целые семена прорастали за 26 суток (рис. 1). Видно, что по ходу стратификации наклевание семян с частично удаленной кожурой постепенно ускорялось, и в конце стратификации (16-17 недель) они прорастали за сутки, что сравнимо с данными по наклеыванию у целых семян.

Мы оценили также темп наклеывания семян, полностью лишенных семенной кожуры. Оказалось, что скорость их наклеывания была еще быстрее, чем у целых семян и семян с «окошечком». Полное удаление кожуры (рис. 2Б) приводило к тому, что отсутствует покой, зависящий от кожуры, и скорость выхода из покоя при полной доступности воды определяется только коротким периодом покоя зародыша. Таким образом, присутствие кожуры не только задерживает поступление воды внутрь зародыша, но и оказывается препятствием для самого проклеывания.

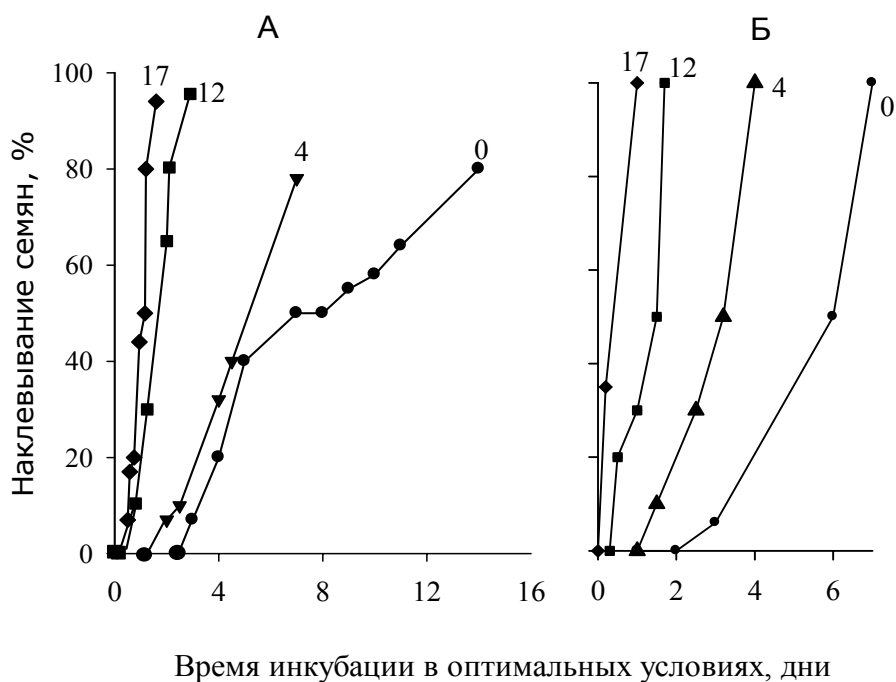


Рис. 2. Динамика прорастания семян каштана с частично удаленной семенной кожурой (А) и без семенной кожуры (Б). Цифрами на кривых обозначены недели стратификации.

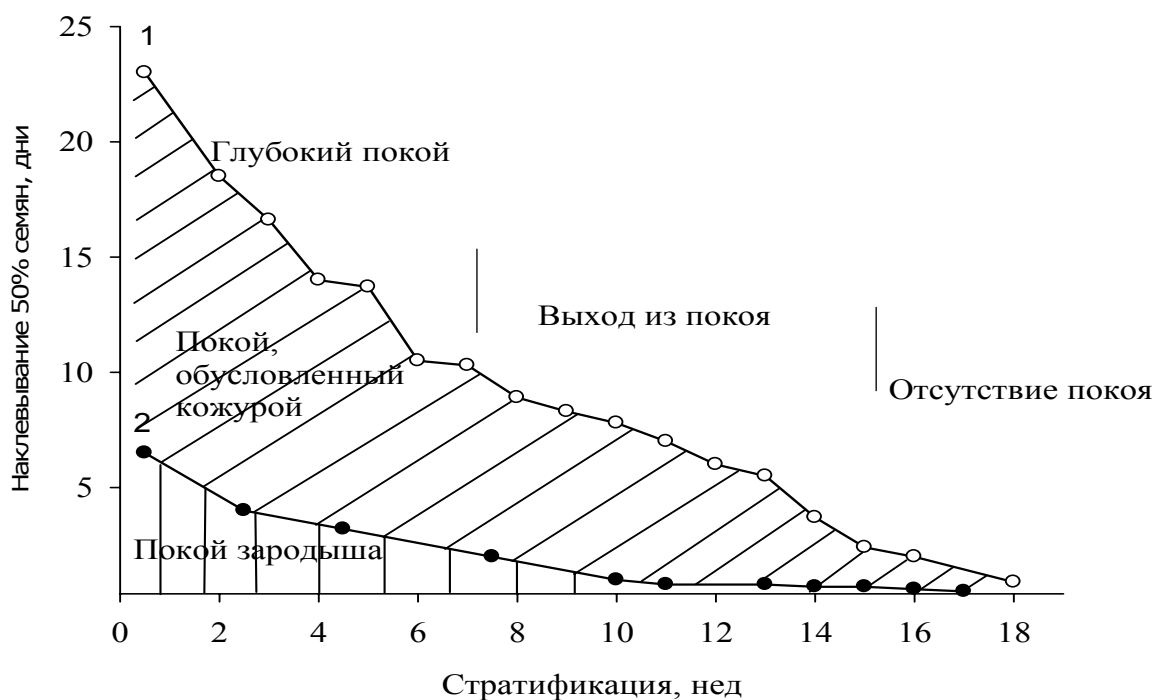


Рис. 3. Соотношение покоя зародыша и покоя, обусловленного кожурой, в стратифицируемых семенах каштана

Чтобы определить соотношение покоя зародыша и покоя, обусловленного кожурой (рис. 3), мы сравнили прорастание целых семян (кривая 1) и семян с частично удаленной семенной кожурой (кривая 2), т.е. с открытой зародышевой осью. Пространство между 1 и 2 кривыми характеризует покой, обусловленный кожурой, а под кривой 2 – покой

самого зародыша. В семенах каштана доминирует покой, обусловленный кожурой, в то время как покой зародыша ослабевает и сходит на нет уже к 6-8 неделе стратификации.

Далее состояние покоя зародыша было изучено на изолированных из семян осевых органах (модель предложена Гумилевской Н.А. и Азаркович М.И. в 2004 г.). Осевые органы способны к росту на воде, без питательных сред. На рисунке 4 показана разница в росте (кривые 3) между осевыми органами из покоящихся (А) и непокоящихся (Б) семян; первые за двое суток дорастают до длины, соответствующей длине осевых органов проросших интактных семян, а вторые – за сутки. Сам факт способности осевых органов к росту даже в покоящихся семенах говорит о том, что они сами по себе находились в состоянии слабого покоя, который легко снимается.

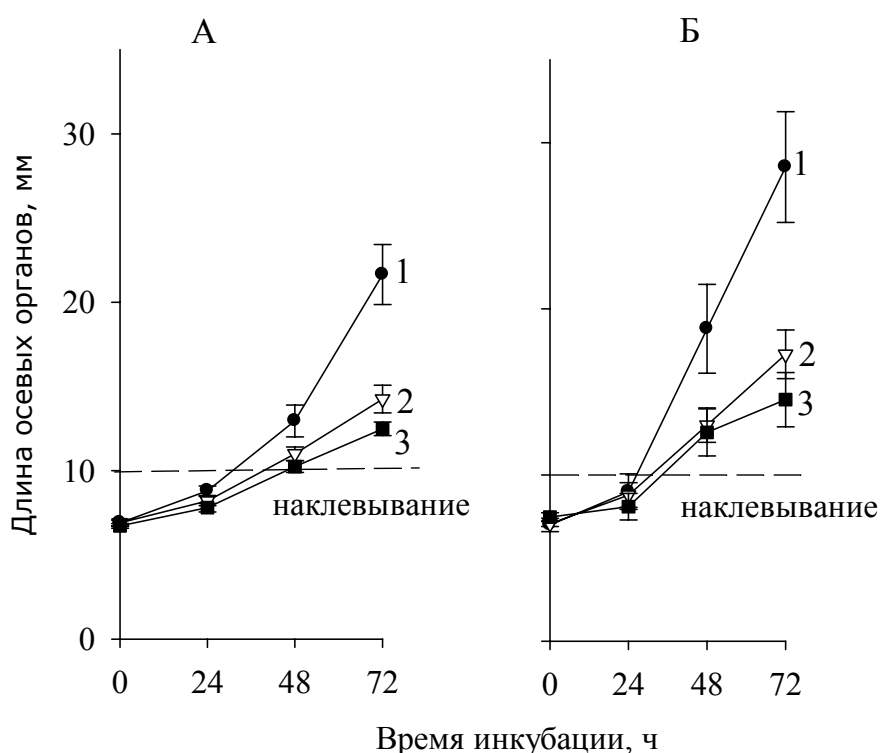


Рис. 4. Влияние семядоли и семядольного черешка на рост осевых органов А - покоящихся, Б - непокоящихся семян. 1- зародышевая ось с черешком и кусочком семядоли, 2 - зародышевая ось с черешком, 3 - отделенная зародышевая ось.

Затем было исследовано влияние семядоли и семядольных черешков на темп наклевывания и дальнейший рост осевых органов. Оказалось, что осевые органы как покоящихся, так и непокоящихся семян с черешком растут несколько быстрее (кривые 2), чем без них. Сохранение кусочка семядоли заметно ускоряет наклевывание и рост оси (сравним кривые 1 и 2), что показывает стимулирующее действие семядолей на прорастание.

Таким образом, осевые органы зародыша, будучи освобождены от покоя, наложенного кожурой, способны легко преодолеть состояние слабого покоя и активно удлиняться.

Далее мы изучили зависимость самого прорастания от поступления воды. Поступление воды в непокоящиеся семена, т.е. семена после 16-18 недель стратификации, было задержано тем, что семена поместили в 30% раствор осмотика ПЭГ-6000, в котором не происходит ни поступления воды в осевые органы, ни ее потери. В этих семенах влажность осевых органов поддерживается на том же уровне (63-65%, табл. 1), что была на протяжении всего периода стратификации.

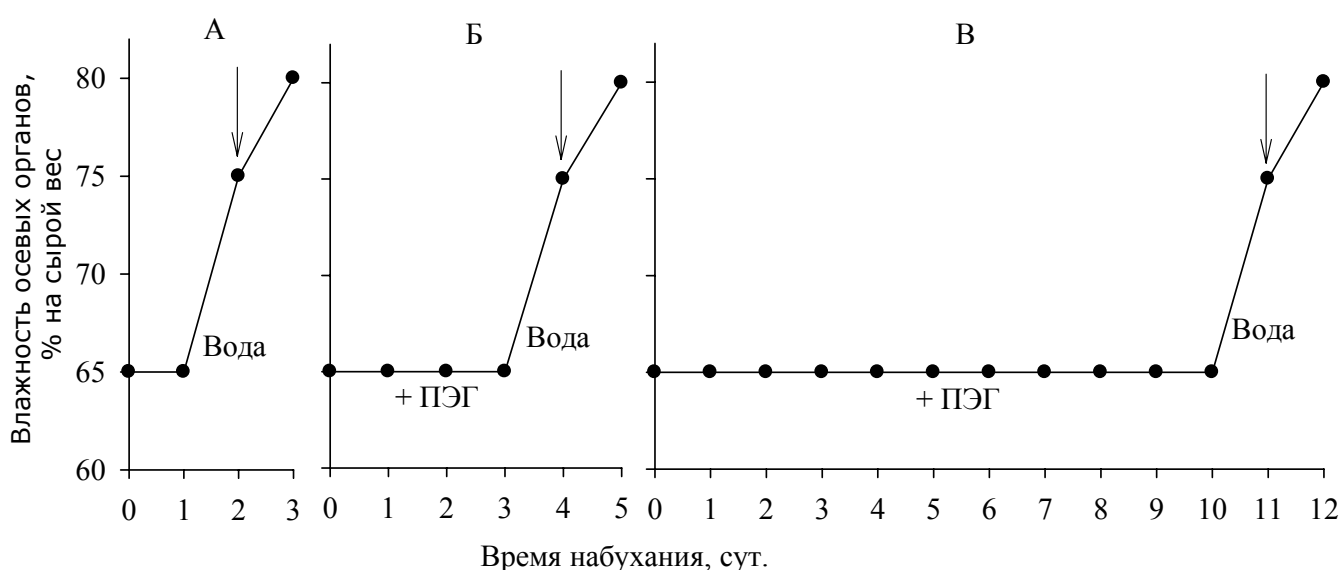


Рис. 5. Влияние полиэтиленгликоля (ПЭГ - 6000) на прорастание вышедших из покоя семян каштана. А – контроль, Б – инкубация в ПЭГ 3 суток, В – инкубация в ПЭГ 10 суток. Стрелкой указано прорастание семян.

Контрольные семена, набухавшие в воде, прорастали очень быстро (100 % за 2 сут) (рис. 5А). Семена в растворе ПЭГ оказались неспособны прорасти в нем вплоть до 10 суток (рис. 5Б и 5В), поскольку их влажность не увеличивалась.

Если же после выдерживания в растворе ПЭГ семена перенести в воду, они начинали прорастать с такой же скоростью, что и контрольные семена. Таким образом, семена каштана, которые вышли из состояния покоя, способны быстро прорасти, если влажность их осевых органов сможет увеличиться до 74%.

2. Изучение состояния вакуолей в осевых органах рекальцитрантных семян каштана.

Судя по способности семян каштана поддерживать высокую оводненность после опадения на протяжении 4-х месяцев (табл. 1), представлялось вероятным, что в клетках

осевых органов сохраняются вакуоли. Для решения этого вопроса было использовано прижизненное окрашивание продольных срезов зародышевой оси с помощью красителя нейтральный красный, который принимает в кислой среде, характерной для вакуолей, яркомалиновую окраску. На рис. 6 представлены фотографии участков гипокотилия (А) и зародышевого корешка (Б), на которых ясно видно такое окрашивание в тканях наружной коры и отсутствие окрашивания в тканях корневого чехлика. Наличие вакуолей было подтверждено также с помощью электронной микроскопии (рис. 7). В клетках гипокотилия из покоящихся семян отчетливо видны небольшие вакуоли, играющие роль водных резервуаров и не превратившиеся в белковые тела.

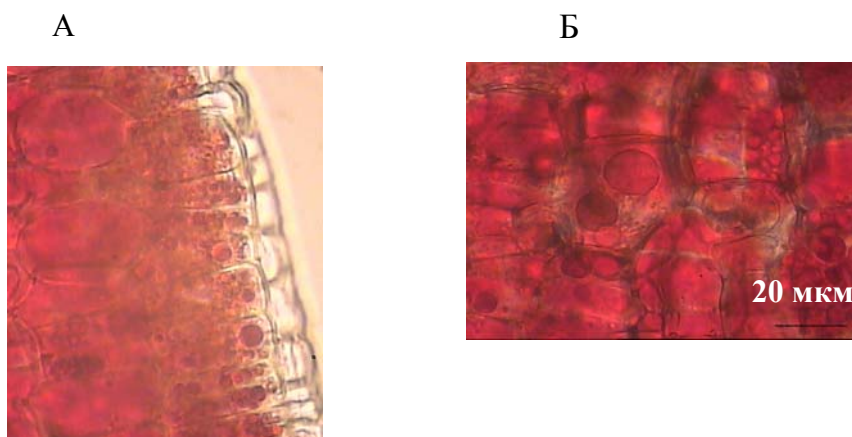


Рис. 6. Прижизненное окрашивание 0.01% нейтральным красным клеток наружных слоев коры осевых органов каштана на продольных срезах. А – гипокотиль, Б – зародышевый корешок.

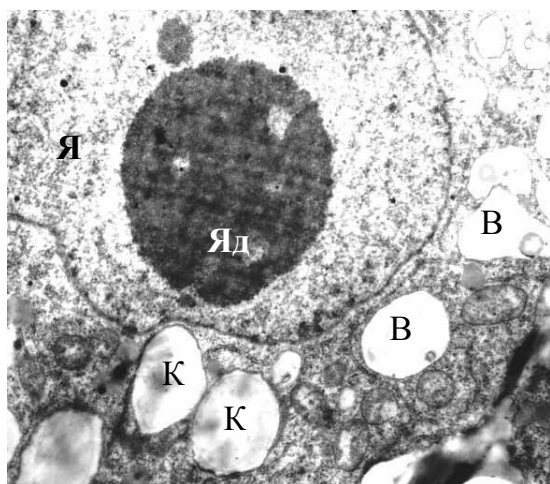


Рис. 7. Электронная микрофотография клеток гипокотилия из покоящихся семян конского каштана. В – вакуоли, Я – ядро, Яд – ядрышко, К – крахмал.

Следующим этапом работы было изучение функциональной активности вакуолей в осевых органах каштана.

Одним из ключевых ферментов вакуоли является H^+ -АТФаза, обеспечивающая энергией все метаболические процессы в вакуоли, и являющаяся маркером зрелых вакуолей (Herman et al., 1994). Молекула H^+ -АТФазы содержит комплекс V_1 , осуществляющий гидролиз АТФ, и комплекс V_0 , функционирующий как протонная помпа. Е-субъединица (вместе с субъединицами С, G и H) участвует в объединении

комплексов V_1 и V_0 и обеспечивает их координированное функционирование (Weuenbach, Wieszogek, 2006). Для анализа вакуолярной H^+ -АТФазы с помощью вестерн-анализа с антисывороткой против E-субъединицы вакуолярной H^+ -АТФазы было обнаружено специфическое взаимодействие антител с полипептидом с мол. массой 29 кДа (рис. 8). E-субъединица вакуолярной H^+ -АТФазы была обнаружена в каждом мм осевых органов, т.е. в корешке (1-2 мм) и гипокотиле (3-10 мм).

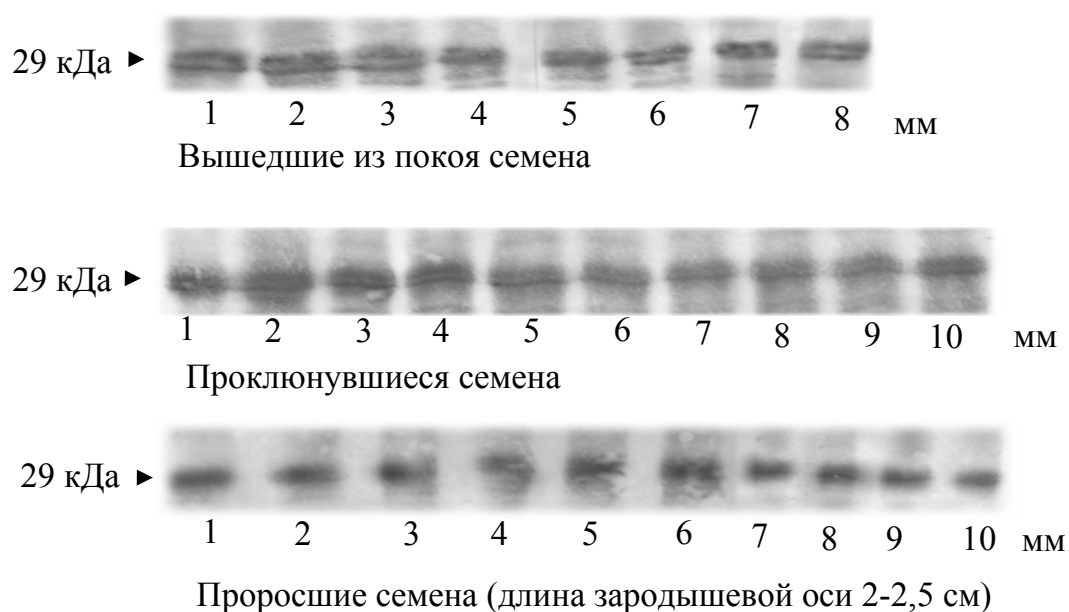


Рис. 8. Вакуолярная H^+ - АТФаза в осевых органах семян конского каштана

Таким образом, присутствие этой субъединицы вакуолярной H^+ -АТФазы указывает на сохранность молекул фермента, обеспечивающего энергией процессы, происходящие в вакуоли. Еще более убедительным доказательством является сохранность вакуолярной инвертазы в течение длительного периода, которая была изучена более подробно.

Наши исследования показали, что кислая вакуолярная инвертаза из осевых органах способна расщеплять *in vitro* два субстрата – сахарозу и раффинозу (рис. 9) и что ее рН-оптимум составляет 5.5. При изучении семян, подвергнутых разным срокам стратификации, оказалось, что в осевых органах как свежеепавших семян, так и на всем протяжении периода покоя обнаруживается активность фермента (рис. 9) примерно на одном уровне. По-видимому, кислая вакуолярная инвертаза сохраняется в осевых органах и находится в активном состоянии на всем протяжении покоя и выхода из него.

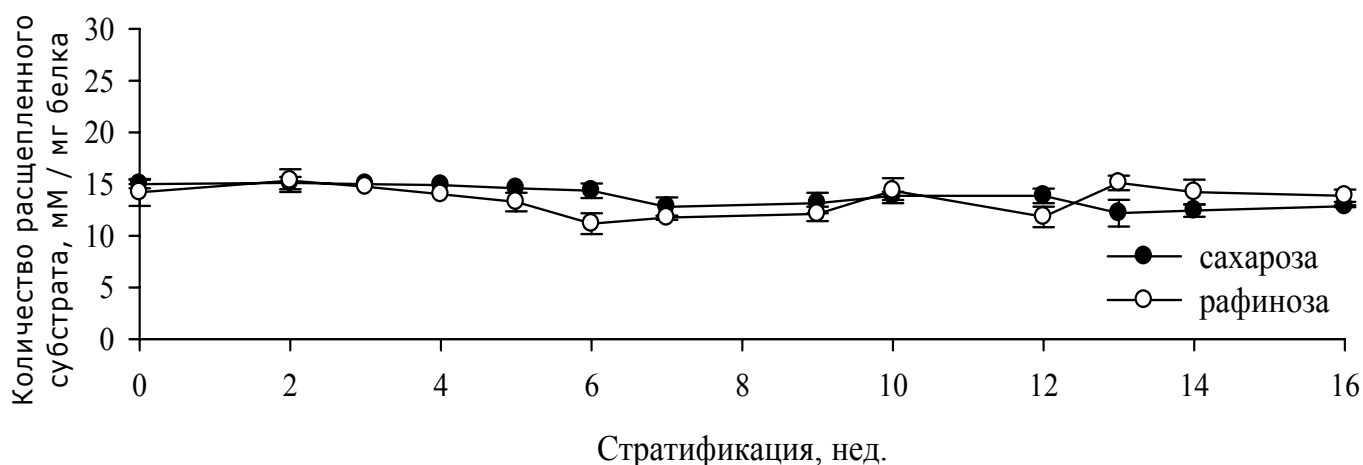


Рис. 9. Активность вакуолярной инвертазы в осевых органах из интактных семян по мере их стратификации

При определении свойств белка инвертазы в геле после нативного электрофореза наблюдалось розово-красное окрашивание образовавшейся фруктозы в верхней части геля в области 500-550 кДа. Как видно на рис. 10, окрашивание не менялось в препаратах белка из осевых органов в течение периода покоя и при прорастании. Таким образом, вакуолярная инвертаза остается активным высокомолекулярным ферментом после опадения семян.

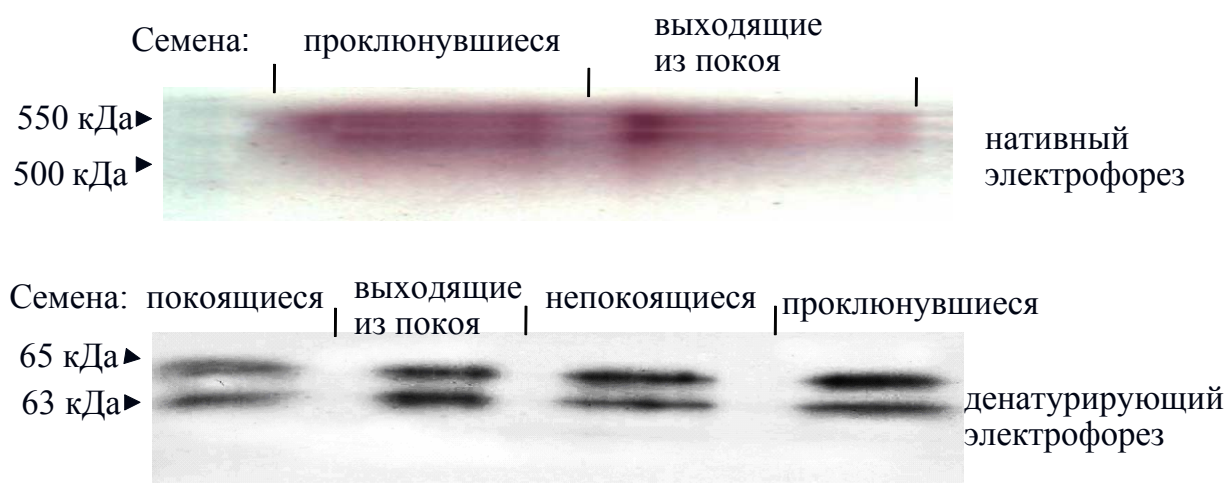


Рис. 10. Молекулярная масса и субъединичный состав вакуолярной инвертазы из осевых органов семян каштана

При анализе геля, содержащего инвертазный белок, с помощью денатурирующего электрофореза выявлены две полосы белка с молекулярной массой 63 и 65 кДа, соответствующие двум субъединицам инвертазы. Вероятно, инвертаза в осевых органах каштана является мультимерным белком, который состоит из 8 субъединиц. Установленная молекулярная масса субъединиц вакуолярной инвертазы, сопоставима с таковой в других объектах (Karupian et al., 1989; Unger et al., 1992; Obenland et al.,

1993; Hashizume et. al., 2003), но степень агрегированности субъединиц в каштане гораздо выше.

Когда семена после стратификации помещали в оптимальные условия, то во время набухания и при проклеивании активность вакуолярной инвертазы в осевых органах заметно усиливалась, что наблюдалось в осевых органах после разных сроков стратификации (рис. 11).

Наблюдаемое усиление активности вакуолярной инвертазы может быть обусловлено либо активацией фермента, либо новообразованием его молекул. Для решения этого вопроса был использован циклогексимид, который в диапазоне концентраций 2-30 мкг/мл является ингибитором трансляции белков и оказывает ингибирующее действие на прорастание (Брукер и др., 1982; Rajjou et al., 2004). Чтобы оценить, происходит ли при набухании и прорастании семян синтез *de novo* молекул вакуолярной инвертазы, были проведены опыты по инкубированию с ингибитором семян с частично удаленной семенной кожурой (табл. 2).

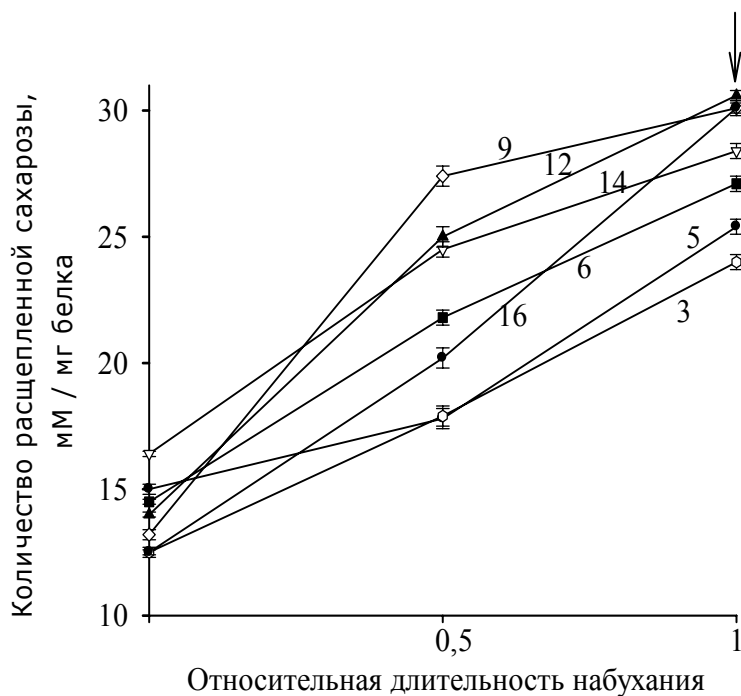


Рис. 11. Активность кислой вакуолярной инвертазы в осевых органах семян каштана при набухании. Цифрами на кривых обозначены недели стратификации, стрелкой указано наклевывание семян.

Время от начала набухания до наклевывания представлено в относительных единицах, т.к. оно становилось короче по мере протекания покоя и выхода из него.

Длительность инкубации составляла от 6 сут для семян после 5 недель стратификации до 1 сут для семян после 16 недель стратификации. Конец инкубации в циклогексимиде соответствовал тому времени, когда в контроле происходило наклевывание семян, хотя в растворе ингибитора наклевывания не было. Активность инвертазы в осевых органах после инкубации с циклогексимидом была ингибирована и в середине набухания, и при наклевывании. Следовательно, в осевых органах возрастание активности инвертазы (рис. 11) происходит как за счет уже имеющихся, так и за счет вновь синтезируемых молекул инвертазы.

Таблица 2. Ингибирование циклогексимидом (30 мкг/мл) активности кислой вакуолярной инвертазы в осевых органах семян каштана (% от контроля)

Длительность стратификации, недели	Ингибирование в середине периода набухания	Ингибирование при прорастании
5	30 ± 2.2	нет данных
6	27 ± 1.3	48 ± 3.0
9	31 ± 1.9	35 ± 2.6
12	нет данных	28 ± 1.8
14	12 ± 1.8	29 ± 2.1
16	12 ± 1.4	23 ± 1.7

Чтобы установить далее, происходит ли синтез молекул фермента при набухании на вновь образованной мРНК или же на долгоживущей мРНК, сформированных еще в созревающих семенах, был применен α -аманитин – ингибитор транскрипции мРНК. α -Аманитин избирательно подавляет синтез мРНК, катализируемый ДНК-зависимой РНК-полимеразой II (Jendrisak, 1980; Bushnell et al., 2002). Известно, что семена прорастают в этом ингибиторе очень медленно, и дальнейшего развития проростка не происходит (Брукер и др., 1982; Rajjou et al., 2004). В опытах с изолированными из семян каштана осевыми органами инкубация в растворе α -аманитина в течение двух суток также задержала проклевывание. В присутствии ингибитора размер и вес осевых органов был меньше, чем в контроле.

При измерении активности фермента оказалось, что α -аманитин не ингибировал активность вакуолярной инвертазы (рис 12). Следовательно, обнаруженный нами (см. табл. 2) синтез части молекул инвертазы *de novo* происходил на долгоживущих матрицах РНК и не нуждался в новом синтезе этих мРНК.

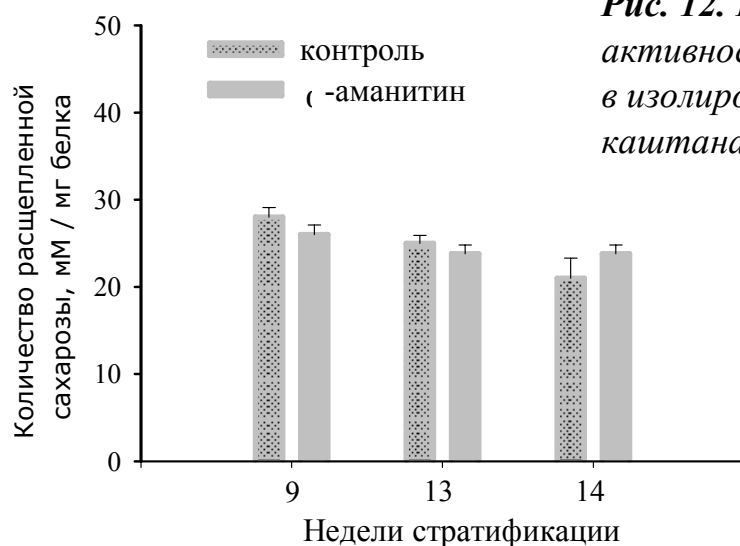


Рис. 12. Влияние α -аманитина на активность вакуолярной инвертазы в изолированных осевых органах каштана при наклевывании.

Таким образом, вакуолярная инвертаза сохраняет свои свойства и активность в осевых органах на протяжении периода покоя, выхода из него и прорастания. При прорастании ее активность возрастает отчасти в результате синтеза дополнительных молекул фермента на преформированных мРНК.

3. Изучение состава и динамики углеводов в осевых органах каштана

Основными углеводами в осевых органах каштана являются сахароза и крахмал. На рис. 7 и 13 видны крахмальные зерна в клетках гипокотилия. Высокое содержание крахмала сохраняется в покое, при набухании и прорастании семян, а расходуется крахмал только после прорастания.

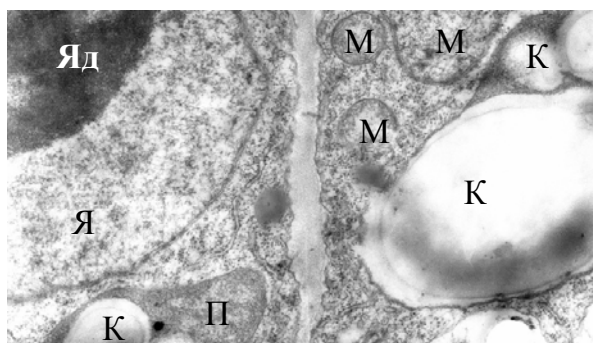


Рис. 13. Крахмальные зерна в клетках гипокотилия покоящихся семян каштана. К – крахмал, Я – ядро, Яд – ядрышко, М – митохондрия, П – пластида.

Ниже (табл. 3) представлены данные по анализу остальных углеводов.

Таблица 3. Углеводы в осевых органах конского каштана, мкг / семя

Состояние семян	Фруктоза	Глюкоза	Сахароза	Рафиноза	Стахиоза	Вербаскоза	
опавшие	12.0 ± 2.4	26.2 ± 4.3	2563.0 ± 87.3	71.7 ± 10.4	130.1 ± 15.9	6.0 ± 1.0	
4 недели	4 сут. набухания	18.9 ± 1.2	13.7 ± 8.0	2736.0 ± 34.1	50.0 ± 3.0	95.9 ± 4.9	11.9 ± 1.1
	7 сут. набухания	22.5 ± 3.1	21.5 ± 2.7	3184.0 ± 58.3	19.3 ± 4.8	37.6 ± 2.3	4.2 ± 0.3
	15-16 сут. набухания (наклонувшиеся)	157.5 ± 19.2	86.9 ± 10.0	3116.6 ± 12.7	30.2 ± 4.6	44.4 ± 3.6	4.3 ± 0.4
9 недель	2 сут. набухания	17.1 ± 2.4	19.0 ± 6.8	2926.0 ± 128.3	54.7 ± 3.3	114.9 ± 7.2	8.9 ± 1.8
	4 сут. набухания	23.4 ± 2.2	31.5 ± 5.4	3145.3 ± 102.3	24.7 ± 2.0	52.1 ± 6.4	5.1 ± 0.4
	10-11 сут. набухания (наклонувшиеся)	137.6 ± 12.4	115.7 ± 26.1	3008.5 ± 137.7	34.2 ± 3.0	65.2 ± 13.4	7.8 ± 0.8
16 недель	1 сут. набухания	26.3 ± 4.0	32.4 ± 1.3	2574.7 ± 27.6	39.6 ± 2.5	81.8 ± 9.8	11.1 ± 1.0
	2 сут. набухания (наклонувшиеся)	125.6 ± 8.5	62.8 ± 2.5	2746.2 ± 83.4	49.7 ± 2.6	137.3 ± 15.0	19.1 ± 4.1

Содержание моносахаров, сахарозы и олигосахаридов было рассчитано в мкг на семя (табл. 3) в осевых органах из покоящихся, выходящих из покоя и прорастающих семян. Преобладающим сахаром является сахароза; из трех олигосахаридов – рафинозы, стахиозы и вербаскозы – наиболее существенно содержание стахиозы, но и ее уровень во много раз ниже уровня сахарозы. Содержание моносахаров в состоянии покоя невелико, но оно увеличивается в несколько раз к моменту прорастанию семян.

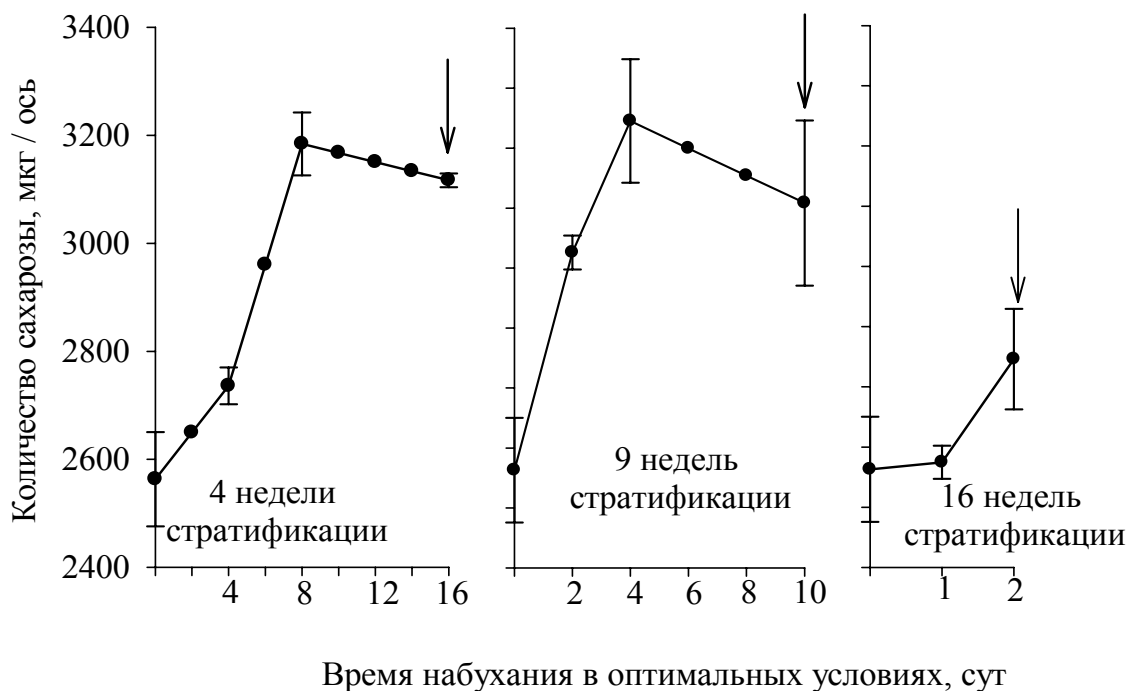


Рис. 14. Динамика содержания сахарозы в осевых органах семян каштана при набухании и наклевывании. Стрелкой указано наклевывание семян.

Поскольку сахарозы много и она занимает центральное положение в обмене углеводов между запасными олигосахаридами и моносахарами, следует рассмотреть ее динамику и превращения в осевых органах семян, переходящих от состояния покоя к прорастанию. Накопление сахарозы в осевых органах происходит в период до середины набухания (рис. 14). В период от середины набухания до наклевывания (после 4 недель стратификации в период от 7 по 15–16 сут. набухания; после 9 нед. стратификации в период от 4 по 10–11 сут. набухания) содержание сахарозы достоверно не меняется. У вышедших из покоя семян (16 недель стратификации) наблюдается накопление сахарозы к моменту наклевывания.

Такое увеличение содержания сахарозы можно было бы объяснить тем, что она образуется за счет распада олигосахаридов, который происходит по схеме стахиоза → рафиноза + галактоза; рафиноза → сахароза + галактоза. Можно ориентировочно подсчитать, сколько может образоваться сахарозы из олигосахаридов в осевых органах у выходящих из покоя семян.

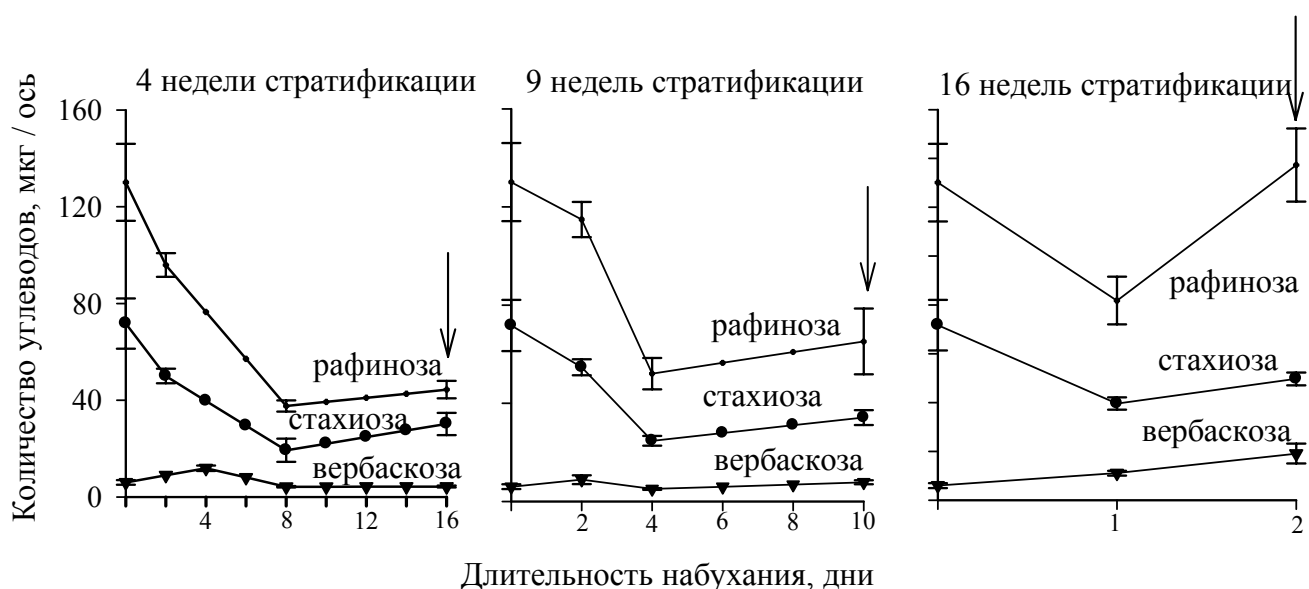


Рис. 15. Динамика рафинозы, стахиозы и вербаскозы в осевых органах семян каштана при набухании и наклевывании (отмечено стрелкой).

Отмечено примерно трехкратное падение уровня олигосахаридов (рис. 15), что может привести к накоплению около 60 мкг сахарозы к середине периода набухания. Если сравнить эту величину с содержанием сахарозы в осевых органах, а именно: с увеличением ее количества к этому периоду (примерно на 500 мкг), – то возрастания количества сахарозы за счет распада олигосахаридов недостаточно, чтобы объяснить ее накопление. Интенсивное накопление сахарозы к середине набухания у выходящих из покоя семян и к наклевыванию у вышедших из покоя семян можно объяснить только активным притоком ее из семядолей в осевые органы. Можно предположить, что столь ранний (задолго до прорастания) приток сахарозы возможен благодаря высокой оводненности проводящих путей.

Низкий уровень моносахаров сохраняется на всем протяжении покоя и выхода из него и на протяжении первой половины набухания (рис. 16). Однако во второй половине набухания наблюдается резкое увеличение количества фруктозы (в 14-15 раз) и глюкозы (в 4-5 раз). Накопление большего количества фруктозы, чем глюкозы, можно отнести за счет интенсивного использования глюкозы, например, как субстрата дыхания.

Такое накопление моносахаров связано с расщеплением сахарозы кислотными инвертазами. Наряду с возрастающей активностью вакуолярной инвертазы (рис. 11), возрастает также активность инвертазы клеточной стенки, рН-оптимум которой 4.5 (рис. 17).

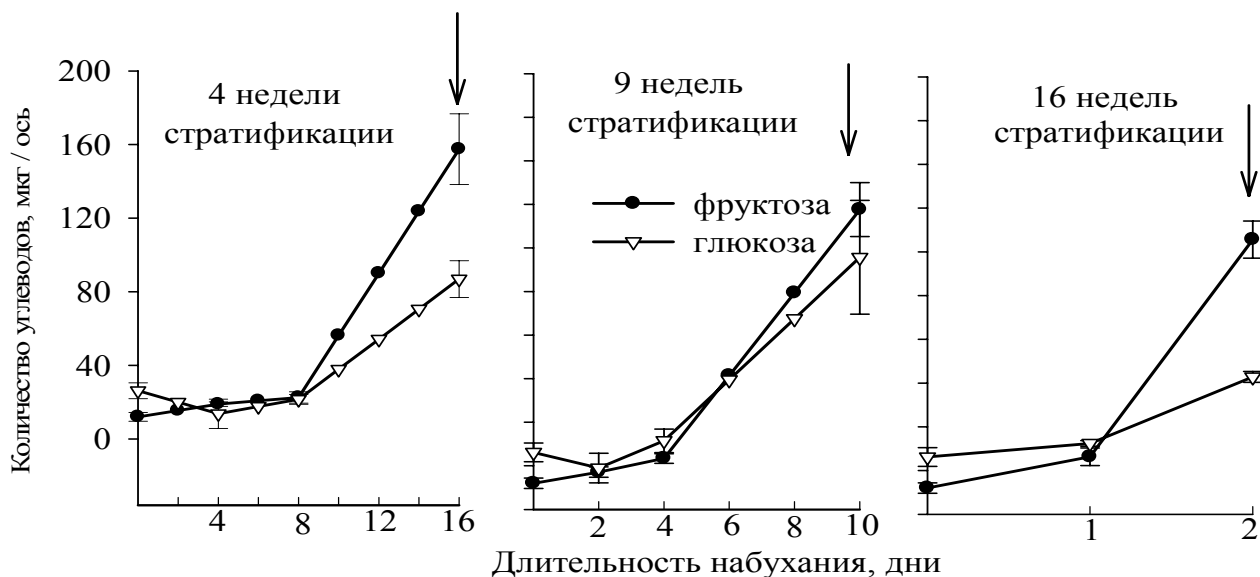


Рис. 16. Динамика содержания фруктозы и глюкозы в осевых органах семян каштана при набухании и наклевывании (отмечено стрелкой).

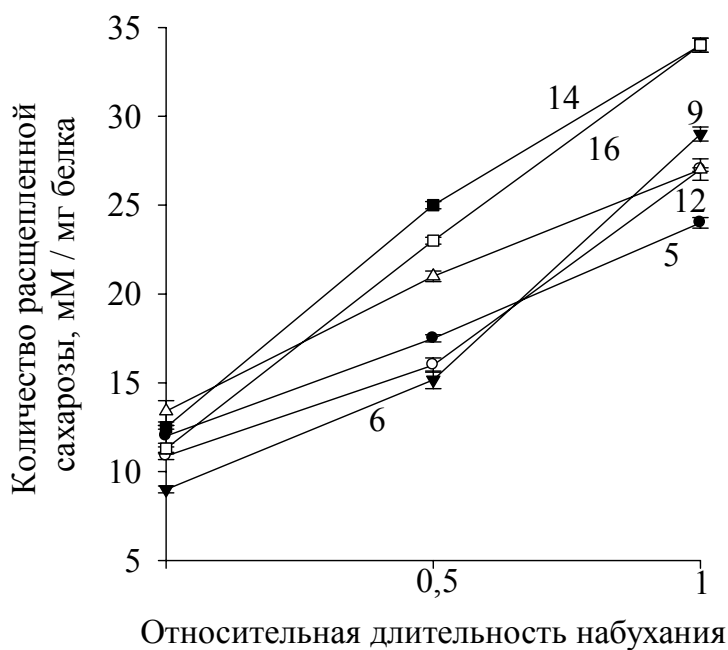


Рис. 17. Активность инвертазы клеточной стенки в осевых органах семян каштана по ходу набухания. Цифрами на кривых обозначены недели стратификации.

Усиление активности обеих инвертаз при набухании приводит к накоплению моносахаров, что обеспечивает активный метаболизм зародышевых осей субстратами и энергией, а также вызывает повышение концентрации осмотически-активных веществ в клетках осевых органов. Расчеты показали, что накопление сахаров повышает осмотическое давление на 18-20%, что в свою очередь способствует поступлению в осевые органы дополнительных количеств воды. Повышение оводненности осевых органов, как было отмечено выше (рис. 5), необходимо для начала прорастания. Таким

образом, ранний приток сахарозы из семядолей и усиление активности инвертаз, приводящие к накоплению сахаров, обеспечивают успешное быстрое прорастание семян конского каштана.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертации впервые изучена физиология рекальцитрантности семян на примере семян конского каштана, отличающегося от других растущих в тропиках рекальцитрантов тем, что в условиях средней России эти семена вынуждены поддерживать рекальцитрантность в течение длительного периода покоя и выхода из него. Таким образом, эти семена являются редким случаем пролонгированной рекальцитрантности, сохраняя долгое время жизнеспособность при низкой температуре, поддерживая высокий уровень оводненности и проявляя способность быстро прорасти по окончании покоя.

Находящиеся в покое семена способны поддерживать в течение нескольких месяцев установившийся при созревании уровень влажности благодаря толстой коже, покрытой восковым налетом, которая препятствует потере воды. Вместе с тем, осевые органы конского каштана, как и других рекальцитрантов, содержат большие количества сахарозы, что обеспечивает возможность поглощения воды извне за счет осмотических сил.

Судя по уровню поддерживаемой влажности в осевых органах (табл. 1), они содержат не только связанную, но и свободную воду, это позволило предположить, что в них хотя бы частично сохраняются вакуоли. Их присутствие было впервые наглядно продемонстрировано (рис. 6 и 7) в наружной коре гипокотилия и зародышевого корешка. Этот вывод был подтвержден сохранением в осевых органах E-субъединицы вакуолярной H^+ -АТФазы (рис. 8).

Еще более убедительное доказательство сохранности самих вакуолей и поддержания их функциональной активности заключается в сохранении активности вакуолярной инвертазы и ее ферментативных и структурных свойств (рис. 9 и 10) на протяжении периода покоя и выхода из него. Таким образом, достигается готовность вакуолей функционировать в вышедших из покоя семенах.

Когда семена вышли из покоя, они способны начать подготовку к инициации роста в осевых органах, то есть к прорастанию. При доступности воды рекальцитрантные семена начинают набухать с высокого уровня влажности (рис. 5). Вслед за поступлением воды начинается приток сахарозы из семядолей (рис. 14) и усиливается активность двух кислых инвертаз – инвертазы клеточных стенок (рис. 17) и вакуолярной инвертазы (рис. 11). На примере вакуолярной инвертазы впервые показано, что усиление ее активности в набухающих семенах во многом связано с синтезом дополнительных молекул фермента на долгоживущей мРНК (рис. 12).

Ранний приток сахарозы следует рассматривать как свойство присущее только рекальцитрантным семенам, возможность его обусловлена высоким уровнем оводненности тканей, в том числе и проводящих путей. Сопровождающее его усиление активности обеих инвертаз приводит к накоплению глюкозы и фруктозы (рис. 16) перед началом прорастания, способствуя увеличению осмотического давления в клетках осевых органов. Сохранность вакуолей облегчает дальнейшую вакуолизацию клеток осевых органов при поступлении дополнительных количеств воды и способствует инициации роста растяжением, то есть прорастанию (рис. 18).

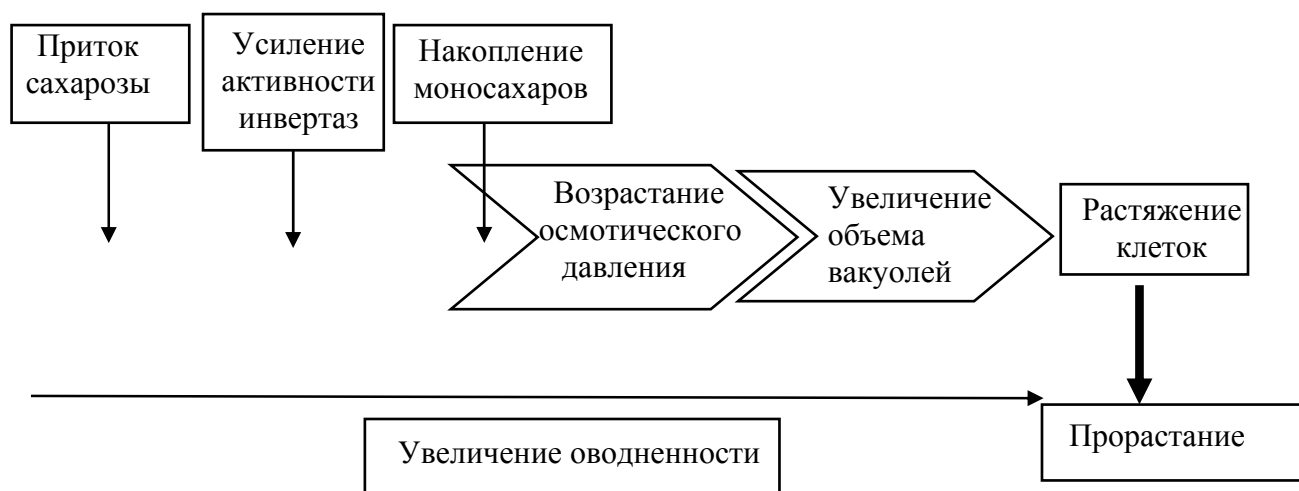


Рис. 18. Последовательность событий в осевых органах, приводящая к быстрому прорастанию рекальцитрантных семян.

Таким образом, быстрое прорастание рекальцитрантных семян определяется поддерживаемой высокой оводненностью осевых органов и ранним притоком сахарозы, сопровождаемым усилением активности инвертаз и образованием сахаров, приводящим к дальнейшему повышению оводненности и прорастанию.

ВЫВОДЫ

1. Семена конского каштана отличаются пролонгированной рекальцитрантностью, охватывающей период покоя и выход из него.
2. Семена каштана обладают покоем, что нетипично для рекальцитрантных семян. Покой обусловлен главным образом кожурой семени, и в слабой степени – осевыми органами зародыша.
3. Показано, что рекальцитрантность покоящихся и выходящих из покоя семян каштана проявляется в поддержании высокой оводненности (63-65%) в осевых органах зародыша и сохранности вакуолей в них.
4. Функциональная готовность вакуолей в осевых органах проявляется в присутствии вакуолярной H^+ -АТФазы и активности кислой вакуолярной инвертазы.

5. Вакуолярная инвертаза сохраняет свои структурные особенности, рН-оптимум 5.5, субстратную специфичность и потенциальную активность в период от опадения семян до прорастания.

6. Увеличение активности вакуолярной инвертазы при набухании и прорастании происходит во многом за счет биосинтеза новых молекул фермента на долгоживущей мРНК.

7. Набухание семян и выход семян из покоя сопровождается уменьшением небольшого пула запасных олигосахаридов (рафинозы и стахиозы) и увеличением содержания доминирующего углевода сахарозы, на фоне минорных количеств моносахаров (глюкозы и фруктозы).

8. Обнаружен ранний приток сахарозы в осевые органы из семядолей, который происходит в начале набухания семян и сопровождается усилением активности инвертаз в вакуоли и в клеточной стенке.

9. Накопление сахаров в осевых органах приводит к увеличению осмотического давления при набухании, усиленному поступлению воды, увеличению вакуолей и быстрой инициации растяжения в клетках осевых органов рекальцитрантных семян.

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

1) Гумилевская Н.А., Азаркович М.И., **Литягина С.В.**, Обручева Н.В. Белки осевых органов покоящихся и прорастающих семян конского каштана. II. Белок – синтезирующая активность. Физиология растений, 2003, т. 50, № 4, с. 517-527.

2) **Литягина С.В.**, Антипова О.В. Содержание осмотиков и активность инвертазы в осевых органах покоящихся и прорастающих семян конского каштана. V Съезд Общества физиологов растений России, Пенза, 2003, тезисы докладов, с. 409.

3) **Литягина С.В.** Активность кислых инвертаз в связи с содержанием осмотиков в покоящихся и прорастающих семенах. Тезисы докладов XI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2004», 2004, секция Биология, с. 90.

4) **Литягина С.В.**, Обручева Н.В. Активность инвертазы и накопление сахаров в покоящихся и прорастающих семенах конского каштана. Материалы VI Международного симпозиума «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования». Москва, 2005, т. I, с. 299-301.

5) Обручева Н.В., **Литягина С.В.**, Рихтер А. Динамика углеводов в осевых органах семян конского каштана при переходе от покоя к прорастанию. Физиология растений, 2006, т. 53, № 6, с. 869 – 879.

6) Obroucheva N.V., **Lityagina S.V.** Dormancy release and germination in recalcitrant horse chestnut seeds. Dendrobiology, 2007, v. 57, pp. 27-34.

7) Obroucheva N.V., Richter A., **Lityagina S.V.** Initiation of source-sink relations in imbibing horse chestnut seeds - Международная научно-практическая конференция «Донорно-акцепторные связи у растений». Калининградский политехнический институт, 2007, с. 43.

8) Обручева Н.В., **Литягина С.В.** Переход семян от покоя к прорастанию и направленность углеводного метаболизма в осевых органах семян конского каштана. Материалы докладов VI Съезда Общества физиологов растений России. Сыктывкар, 2007, т. 2, с.336-337.

9) **Литягина С.В.**, Обручева Н.В. Углеводы в прорастающих рекальцитрантных семенах конского каштана. Материалы V Международной научной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений». Минск, Беларусь, 2007, с. 129.

10) Обручева Н.В., **Литягина С.В.** Углеводный обмен в осевых органах прорастающих семян конского каштана в связи с их рекальцитрантностью. Материалы VII Международного симпозиума «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования», Москва, 2007, т. 2, с. 254 - 256.

11) **Литягина С.В.** Динамика накопления сахаров и активность инвертазы в осевых органах прорастающих семян конского каштана. Тезисы докладов XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов-2008”, 2008, секция Биология, с. 191.

12) Obroucheva N.V., **Lityagina S.V.**, Richter A. Initiation of source-sink relations during horse chestnut seed germination. Acta Horticulturae, 2009, v. 835, pp. 137 - 142.

13) Обручева Н.В., **Литягина С.В.** Кислая вакуолярная инвертаза в покоящихся и прорастающих семенах конского каштана. Онтогенез, 2009, т. 40, с. 419 - 424.

14) **Литягина С.В.**, Обручева Н.В. Вакуолярная инвертаза в осевых органах прорастающих семян каштана. Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования. Москва, 2009, т. 3, с. 145 - 148.

15) **Литягина С.В.** Изучение кислой вакуолярной инвертазы осевых органов семян конского каштана. Материалы международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2009», секция Биология, 2009, с. 233.

16) **Литягина С.В.** Характеристика вакуолярной инвертазы в покоящихся и прорастающих семенах конского каштана. Материалы VI-й Международной научной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений», Минск, 2009, с. 93.

17) Obroucheva N.V., **Lityagina S.V.** Water relations in embryo axes of germinating recalcitrant and orthodox seeds. Тезисы доклада на конференции «Seed Ecology III», Солт-Лейк Сити, США, 2010, p. 126-127.