

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
СИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Каф

Корсукова Анна Викторовна

**ИЗМЕНЕНИЕ ХОЛОДО- И МОРОЗОУСТОЙЧИВОСТИ ПРОРОСТКОВ
ЗЛАКОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТЕБУКОНАЗОЛ-СОДЕРЖАЩЕГО
ПРОТРАВИТЕЛЯ СЕМЯН**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

**диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Научный руководитель:
доктор биологических наук, доцент
Грабельных Ольга Ивановна

Иркутск – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА РАСТЕНИЯ	12
1.2. МЕХАНИЗМЫ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ЗАКАЛИВАНИЯ ТРАВЯНИСТЫХ РАСТЕНИЙ	19
1.2.1. Ингибирование роста	25
1.2.2. Изменение липидного и жирнокислотного состава	25
1.2.3. Синтез стрессовых белков	31
1.2.4. Накопление сахаров	38
1.2.5. Изменение дыхательного метаболизма	42
1.3. ПРОЦЕССЫ, ПРОТЕКАЮЩИЕ В ПЕРИОД РАЗЗАКАЛИВАНИЯ ТРАВЯНИСТЫХ РАСТЕНИЙ	48
1.3.1. Зависимость скорости раззакаливания от температуры и длительности её воздействия	49
1.3.2. Физиолого-биохимические изменения при раззакаливании	50
1.4. РОСТИНГИБИРУЮЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ КАК МОДУЛЯТОРЫ ХОЛОДО- И МОРОЗОУСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ	53
1.4.1. Применение ретардантов в сельском хозяйстве	54
1.4.2. Фунгициды триазольной природы как возможные регуляторы холодо- и морозоустойчивости злаков	57
1.5. ВЫВОДЫ ИЗ ОБЗОРА ЛИТЕРАТУРЫ, ФОРМУЛИРОВКА ЦЕЛИ ИССЛЕДОВАНИЯ	61
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	64
2.1. Растительный материал	64
2.2. Схема опытов	64
2.3. Изучение ростовых процессов	68
2.4. Определение жизнеспособности клеток coleoptiles	68
2.5. Определение содержания водорастворимых углеводов	69
2.6. Анализ жирнокислотного состава	70
2.7. Выделение митохондрий	71
2.8. Полярнографический анализ	72
2.9. Экстракция суммарного клеточного, цитоплазматического и митохондриального белка	74

2.10. Денатурирующий гель-электрофорез	75
2.11. Вестерн-блоттинг	76
2.12. Список использованных реактивов.....	78
2.13. Статистическая обработка данных.....	79
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ	80
3.1. ТЕБУКОНАЗОЛ-СОДЕРЖАЩИЙ ПРОТРАВИТЕЛЬ СЕМЯН «БУНКЕР» ЭФФЕКТИВНО ИНГИБИРУЕТ РОСТОВЫЕ ПРОЦЕССЫ ПРОРОСТКОВ ЗЛАКОВ, НО НЕ ОКАЗЫВАЕТ ФИТОТОКСИЧНОГО ДЕЙСТВИЯ НА КЛЕТКИ РАСТЕНИЙ	80
3.1.1. Влияние протравителя семян «Бункер», тебуконазола и экзогенной абсцизовой кислоты на рост coleoptилей побегов злаков	81
3.1.2. Влияние препарата «Бункер» на жизнеспособность клеток coleoptилей злаков ...	86
3.2. ВЛИЯНИЕ ТЕБУКОНАЗОЛ-СОДЕРЖАЩЕГО ПРОТРАВИТЕЛЯ СЕМЯН «БУНКЕР» НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ЗАКАЛИВАНИЯ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ, ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ И ОЗИМОЙ РЖИ	92
3.2.1. Влияние обработки семян препаратом «Бункер» на жирнокислотный состав в тканях побегов яровой пшеницы, озимой пшеницы и озимой ржи при холодном закаливании.....	92
3.2.2. Влияние обработки семян препаратом «Бункер» на синтез дегидринов в тканях яровой пшеницы, озимой пшеницы и озимой ржи при холодном закаливании	102
3.2.3. Влияние обработки семян препаратом «Бункер» на содержание сахаров в тканях яровой пшеницы, озимой пшеницы и озимой ржи при холодном закаливании и раззакаливании	107
3.2.4. Влияние обработки семян препаратом «Бункер» на изменение интенсивности дыхания тканей яровой пшеницы, озимой пшеницы и озимой ржи при холодном закаливании и раззакаливании.....	113
3.3. ВЛИЯНИЕ ТЕБУКОНАЗОЛ-СОДЕРЖАЩЕГО ПРОТРАВИТЕЛЯ СЕМЯН «БУНКЕР» НА ХОЛОДО- И МОРОЗОУСТОЙЧИВОСТЬ ЗЛАКОВ ПРИ ЗАКАЛИВАНИИ И ПОСЛЕ РАЗЗАКАЛИВАНИЯ	118
3.4. ВЛИЯНИЕ РОСТИНГИБИРУЮЩИХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ И ФОСФОРИЛИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ПШЕНИЦЫ	121
3.4.1. Окислительная и фосфорилирующая активность митохондрий при использовании препарата «Бункер» и тебуконазола в контрольных условиях.....	121
3.4.2. Окислительная и фосфорилирующая активность митохондрий при использовании препарата «Бункер» и тебуконазола при холодном закаливании.....	127
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	133
ВЫВОДЫ	143
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	144

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБК – абсцизовая кислота
АДФ – аденозин-5'-дифосфат
АДФ:О – отношение фосфорилированного АДФ к количеству
утилизированного при этом кислорода
АО – альтернативная антимицин А- и цианид-резистентная оксидаза
АП – альтернативный путь дыхания
АПБ – ацил-переносающий белок
АТФ – аденозин-5'-трифосфат
АФК – активные формы кислорода
БГК – бензгидроксаметовая кислота
БСА – бычий сывороточный альбумин
БТШ – белки теплового шока
БХШ – белки холодового шока
ГБ (ГК) – гиббереллины (гибберелловая кислота)
д.в. – действующее вещество
ДДС – додецилсульфат натрия
ЖК – жирные кислоты
ИДС – индекс двойной связи
ИН ЖК – индекс ненасыщенности жирных кислот
КДК – коэффициент дыхательного контроля
МБ – митохондриальный белок
МЭЖК – метиловые эфиры жирных кислот
НАД⁺, НАД·Н – окисленная и восстановленная формы
никотинамидадениндинуклеотида
НАДФ⁺, НАДФ·Н – окисленная и восстановленная формы
никотинамидадениндинуклеотидфосфата
НЖК – насыщенные жирные кислоты
ННЖК – ненасыщенные жирные кислоты
ПДК – пируватдегидрогеназный комплекс
ПКГ – программируемая клеточная гибель
ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты
ПОЛ – перекисное окисление липидов
ПФП – пентозофосфатный путь дыхания

СЖК – свободные жирные кислоты
 СКБ – суммарный клеточный белок
 ТМФД – тетраметил-п-фенилендиамин
 ТТХ – 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид
 УДФ – уридин-5'-дифосфат
 ФЛ – фосфолипиды
 ФЛД – фосфолипаза D
 ФМСФ – фенилметилсульфонилфторид
 ЦБ – цитоплазматический белок
 ЦКП – центр коллективного пользования
 ЦП – цитохромный путь дыхания
 ЭДТА – этилендиаминтетраацетат
 ЭТЦ – электрон-транспортная цепь
 BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) – 5-бromo-4-хлоро-3-индолил фосфат
 COR/cor (COLD Regulated) белки/гены – холодорегулируемые белки/гены
 DMSO (dimethyl sulfoxide) – диметилсульфоксид
 ECL – эквивалентная длина алифатической цепи
 LEA-белки (Late Embryogenesis Abundant) – белки позднего эмбриогенеза
 LSD (Least Significant Difference) – метод группирования выборок с наименьшей значимой разностью
 MOPS (3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid) – 3-(N-Морфолино)пропансульфоновая кислота
 NBT (nitroblue tetrazolium) – нитросиний тетразолий
 P450_{14Dm} – цитохром P450-зависимая 14- α -деметилаза
 PUMP (Plant Uncoupling Mitochondrial Protein) – растительные митохондриальные разобщающие белки
 RAB-белки (Responsive to ABA) – белки, синтез которых регулируется АБК
 SB (Sample Buffer) – буфер для образца
 SDS-PAGE – денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия
 TBS (tris-buffered saline) – трис-солевой буфер
 TEMED (tetramethylethylenediamine) – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин
 TTBS – трис-солевой буфер, содержащий Твин-20

ВВЕДЕНИЕ

Формирование морозоустойчивости растений обусловлено различными изменениями клеточного метаболизма, в том числе увеличением содержания сахаров, синтезом стрессовых белков, изменением свойств мембран, процессов дыхания, фотосинтеза и др. (Чиркова, 2002; Колесниченко и Войников, 2003; Трунова, 2007; Gulick et al., 2005; Szalai et al., 2009; Theocharis et al., 2012; Vítamvás et al., 2012). Изменения, протекающие при холодовом закаливании, направлены на предотвращение образования внутриклеточного льда, при этом морозостойкие растения выживают при образовании межклеточного и внеорганного льда (Трунова, 2007). Успешное закаливание в осенний период определяет выживаемость растений в поздний зимний и ранний весенний периоды (Пыйклик, 1963). В период раззакаливания озимых при выходе из состояния вынужденного покоя и переходе к вегетации в весенний период имеет большое значение более длительное сохранение свойств морозоустойчивости. Из литературы известно, что раззакаливание представляет собой процесс, противоположный процессу закаливания (Kalberer et al., 2006). При этом скорость раззакаливания зависит от температуры окружающей среды. Когда растения переходят к активной вегетации, раззакаливание становится необратимым, растения теряют приобретённую морозоустойчивость и могут погибнуть при возобновлении морозов.

Регуляторы роста (как природные, так и синтетические) оказывают влияние на морозостойкость растений, регулируя (удлиняя) продолжительность покоя. Так, экзогенная абсцизовая кислота (АБК) приводит к дополнительному приросту устойчивости растений, способствуя накоплению в клетках защитных соединений, таких как сахара (Kerepesi et al., 2004; Liu et al., 2013), стрессовые белки (Шакирова и др., 2009; Таланова и др., 2011; Титов и Таланова, 2011; Theocharis et al., 2012). АБК стабилизирует клеточные мембраны, повышая уровень ненасыщенности жирных кислот (Bakht et al., 2006).

В настоящее время в сельском хозяйстве активно используются системные фунгициды – ингибиторы C^{14} -деметиличивания, среди которых ведущие позиции занимают азолы, содержащие в своей молекуле триазольную или имидазольную группы. Наибольшее применение получили производные 1,2,4-триазола – ингибиторы синтеза стерина и терпеноидов (Попов и др., 2003). Производные 1,2,4-триазола обладают фунгицидными свойствами (Прусакова и Чигова, 1998; Попов и др., 2003), помимо этого они являются ретардантами (вызывают торможение удлинения междоузлий у зерновых культур, нарушая синтез гиббереллина) (Прусакова, 1989; Haughan et al., 1988; Kende and Zeevaart, 1997; Vettakkorumakankav et al., 1999). Обнаружено и другое их влияние на баланс фитогормонов, в частности, показана их способность увеличивать содержание АБК (Павлова и др., 1995; Прусакова и Чигова, 1998; Павлова, 2003; Чигова и др., 2005). Триазолы характеризуются низкой фитотоксичностью по сравнению с другими ретардантами, эффективны в малых дозах и экологически безопасны. Имеются данные о способности некоторых производных триазола повышать морозоустойчивость растений (Прусакова и Чигова, 1998). Можно предполагать, что регуляторы роста растений, обладающие ретардантными свойствами, могут быть эффективны для повышения морозоустойчивости растений и поддержания свойств морозоустойчивости в период раззакаливания.

Относительно механизмов повышения морозоустойчивости растений, их успешного выхода из закалённого состояния и роли в этом процессе ретардантов триазольной природы имеется недостаточно сведений. Тебуконазол, относящийся к производным 1,2,4-триазола, широко применяется в сельском хозяйстве в качестве системного фунгицида профилактического и лечебного действия, но относительно его участия в механизмах повышения холодо- и морозоустойчивости растений недостаточно известно.

Целью диссертационной работы было изучение изменений физиологических и биохимических параметров, определяющих холодо- и морозоустойчивость проростков злаков, выращенных из семян, обработанных тебуконазол-содержащим протравителем.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи:**

- 1) исследовать влияние тебуконазол-содержащего протравителя семян (содержание тебуконазола 60 г/л) на жизнеспособность клеток coleoptилей, ростовые процессы, холодо- и морозоустойчивость этиолированных проростков яровой пшеницы, озимой пшеницы и озимой ржи;
- 2) оценить влияние тебуконазол-содержащего протравителя семян на жирнокислотный состав исследуемых злаков до и после холодого закаливания;
- 3) изучить изменения содержания дегидринов и сахаров и интенсивности дыхания у исследуемых злаков под действием тебуконазол-содержащего препарата при холодого закаливании и в период раззакаливания;
- 4) провести сравнительный анализ влияния тебуконазол-содержащего протравителя семян и тебуконазола на функционирование митохондрий озимой пшеницы до и после холодого закаливания.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Тебуконазол-содержащий протравитель семян, проявляющий ретардантный эффект на проростках злаков, способствует повышению ненасыщенности жирных кислот, синтезу дегидринов и накоплению водорастворимых углеводов – факторов, определяющих низкотемпературную адаптацию растений.
2. Фунгицид тебуконазол оказывает влияние на дыхательный метаболизм злаков, снижая скорость окисления субстратов дыхания митохондриями. Действие тебуконазола направлено на комплекс I дыхательной цепи митохондрий растений.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное изучение влияния тебуконазол-содержащего протравителя семян (содержание тебуконазола 60 г/л) на параметры морозоустойчивости злаков. Установлено, что обработка семян яровых и озимых злаков тебуконазол-содержащим протравителем семян вызывает ингибирование роста побегов и приводит к изменению углеводного,

жирнокислотного и белкового метаболизма в проростках злаков. Впервые показано, что после обработки семян тебуконазол-содержащим препаратом в клетках злаков происходят метаболические изменения, характерные для низкотемпературной адаптации – увеличение содержания водорастворимых углеводов и ненасыщенных жирных кислот. Выявлено, что закалённые к холоду проростки яровой и озимой пшеницы из обработанных семян характеризуются повышенным содержанием водорастворимых углеводов, синтезом низкомолекулярных дегидринов и ростом холодо- и морозоустойчивости. Более высокое содержание сахаров, дегидринов и ненасыщенных жирных кислот у проростков из обработанных семян способствует сохранению морозоустойчивости озимой пшеницы в период раззакаливания и снижает гибель растений при последующем действии отрицательной температуры.

Впервые с использованием изолированных митохондрий озимой пшеницы установлено, что тебуконазол оказывает влияние на дыхательный метаболизм злаков, действуя на начальный участок дыхательной цепи митохондрий – комплекс I, что снижает окислительную и фосфорилирующую активность митохондрий.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные расширяют современные представления о механизмах холодо- и морозоустойчивости растений и свидетельствуют о возможности формирования повышенной устойчивости озимых культур к перенесению неблагоприятных низких температур под действием обработки семян тебуконазол-содержащими препаратами. Созданы предпосылки использования фунгицидов триазольной природы для повышения устойчивости озимых злаков к отрицательным температурам в зимний и ранневесенний периоды.

Материалы исследований применяются в учебном процессе на биолого-почвенном факультете ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет». Результаты работы могут быть использованы в образовательных и научно-исследовательских учреждениях по профилю рассматриваемой диссертации.

Связь работы с плановыми исследованиями и научными программами. Исследования проводились с 2012 по 2015 гг. в рамках тематических планов НИР лаборатории физиологической генетики СИФИБР СО РАН по проектам ФНИ VI.49.1.1. «Молекулярные механизмы взаимодействия информационной и энергетической систем клеток при стрессе, изучение механизмов устойчивости растений к абиотическим стрессам; разработка физиолого-биохимических критериев оценки полиморфизма устойчивости растений к неблагоприятным факторам внешней среды» (№ гос. регистрации 01201056460) и VI.56.1.1. «Изучение генетических и физиолого-биохимических механизмов роста и устойчивости растений при флуктуациях внешних условий» (№ гос. регистрации 01201353693) и при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (№ 2012-1.1-12-000-2008-6400) (2012-2013 гг.).

Личное участие автора. Диссертация написана автором самостоятельно. В диссертационной работе использованы экспериментальные материалы, полученные лично автором, а также совместно с сотрудниками лаборатории физиологической генетики СИФИБР СО РАН. Автор лично принимал участие в планировании и проведении экспериментов, в статистической обработке, обобщении и интерпретации полученных данных, а также в написании статей, опубликованных по результатам работы.

Апробация работы. Результаты исследований были представлены и обсуждались на VIII Съезде Всероссийского общества физиологов растений и Всероссийской научной конференции с международным участием и школе для молодых учёных «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (Петрозаводск, 2015), Всероссийской научной конференции «Механизмы регуляции функций растительных органелл» (Иркутск, 2014), научно-теоретической конференции ИГУ (Иркутск, 2015).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 научных работ, в том числе 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ для защиты кандидатских диссертаций.

Структура и объём работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Список цитированной литературы включает 346 работ, из них 157 отечественных. Работа изложена на 181 странице машинописного текста, содержит 7 таблиц и 26 рисунков.

Благодарности. Автор выражает глубокую сердечную благодарность научному руководителю д.б.н., доценту О.И. Грабельных за всестороннюю помощь, ценные советы и рекомендации и д.б.н., доценту Т.П. Побежимовой за ценные советы и рекомендации. Автор благодарен сотрудникам лаборатории физиологической генетики СИФИБР СО РАН к.б.н. О.А. Боровик, вед. технолог Н.А. Королевой, вед. инженеру Т.Г. Горностай за помощь в проведении экспериментальной работы и сотруднику лаборатории физико-химических методов исследований СИФИБР СО РАН вед. технолог Н.А. Соколовой за методическую помощь. Автор благодарит заведующего лабораторией физиологической генетики СИФИБР СО РАН д.б.н., профессора В.К. Войникова и весь коллектив лаборатории за тёплое отношение и моральную поддержку. Автор выражает искреннюю благодарность д.б.н., профессору Г.Б. Боровскому, д.б.н. Н.В. Озолиной и к.б.н. Н.В. Дорофееву за ценные рекомендации при обсуждении работы.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА РАСТЕНИЯ

Температура является одним из основных абиотических факторов окружающей среды. Установлено, что лишь на 23% территории суши, где среднегодовая температура воздуха в течение нескольких часов может превышать 40 °С, растения испытывают негативное влияние высоких температур (Кошкин, 2010). Действию же низких температур в течение года подвергается большая часть растений земного шара. Растительность субтропиков, в основном, страдает от действия низких положительных температур, хотя в определённые периоды температура в этих районах опускается ниже 0 °С. В зонах с умеренным климатом температура снижается до –20...–40 °С, а в более северных районах – ещё ниже (Трунова, 2007).

Климатические условия определяют возможность возделывания важнейших сельскохозяйственных культур, например пшеницы, и представляют собой наиболее серьёзную опасность для их успешного культивирования. При этом в качестве лимитирующего фактора, в первую очередь, выступают низкие температуры, поскольку очень немногие районы на Земле (с невысокой влажностью) можно считать слишком жаркими для выращивания пшеницы. В связи с тем, что тропики характеризуются высокой влажностью, возделывание пшеницы ограничивается, главным образом, зоной умеренного климата. При этом практически ежегодно происходит гибель посевов озимой пшеницы на больших площадях в районах её традиционного выращивания в результате периодических снижений температуры, заморозков в течение вегетационного периода и критических морозов (Лэмб, 1970; Дорофеев и др., 2004; Трунова, 2007). Для посевов озимой пшеницы наибольшую угрозу представляют различные типы зимних повреждений. Также критическим считается ранний весенний период, когда после схода снежного покрова, может происходить значительное снижение температуры. Выделяют несколько причин гибели озимых, которые вызываются прямым или косвенным действием низкой

температуры: 1) *вспучивание почвы* (происходит, когда в почве со свободно перемещающейся капиллярной водой образуются столбики или линзы льда); 2) *вспучивание почвы* приводит к *выпиранию* (при этом узел кушения поднимается вспученной почвой, происходят разрывы мелких корней; оттаивая, почва оседает, а узел кушения и часть корней остаются оголёнными); 3) из-за высокого снежного покрова и неглубокого промерзания почвы возникает *выпревание* с последующим поражением посевов *снежной плесенью*; 4) *образование ледяной корки* (когда оттепели сменяются снижением температуры); 5) *вымокание* (за счёт скапливания талых вод); 6) если талые воды замерзают, растения могут погибнуть из-за *недостатка кислорода*; 7) при сильных и продолжительных ветрах органы зимующих растений, располагающиеся выше снежного покрова, сильно обезвоживаются, высыхают – *зимняя засуха*; 8) *зимне-весенние «ожоги»* могут появиться на южной стороне неопробковевших органов зимующих растений в районах с солнечной зимой; и, наконец, 9) *вымерзание* – непосредственное действие неблагоприятных температур на растение (Лэмб, 1970; Дорофеев и др., 2004; Косулина и др., 2011; Кузнецов и Дмитриева, 2011).

Наиболее чувствительны к холоду и морозу недифференцированные делящиеся клетки и клетки в фазе растяжения. Гибель клеток происходит из-за изменений в протопласте, которые начинаются уже при действии низких положительных температур и становятся необратимыми при отрицательных температурах (Самыгин, 1974; Кошкин, 2010). В клетке снижается число рибосом, разрушаются микротрубочки, происходит конденсация хроматина, плотность цитоплазмы уменьшается за счёт её обезвоживания, вследствие этого повышается концентрация клеточного сока, изменяется показатель pH, происходит коагуляция и денатурация коллоидов (Кошкин, 2010).

Наиболее устойчивы к гипотермии двумембранные органоиды – митохондрии и хлоропласты. Эти органеллы способны изменять свою морфологию и протекание метаболических процессов при действии закалывающих температур. Так, закалывание приводит к появлению митохондрий необычных форм (гантелевидных, чашевидных, тороидальных,

образование митохондриального ретикулума), что обеспечивает высокий уровень энергетического обмена, синтез криозащитных веществ, пролиферацию митохондрий (Кислюк и др., 1995; Абдрахимова и др., 1998; Чиркова, 2002). При закаливании растений арабидопсиса наблюдалось значительное увеличение числа хлоропластов в клетке и количества тилакоидов в гране, увеличивалась площадь гран хлоропластов. Данные изменения приводили к поддержанию фотосинтеза в условиях низких положительных температур и на фоне сниженного дыхания – к накоплению сахаров в листьях растений (Астахова и др., 2014). Подобные изменения хлоропластов наблюдали ранее при холодовом закаливании озимых злаков (Климов и др., 1993). В то же время длительное влияние критических температур на незакалённые растения приводит к набуханию и деградации митохондрий и хлоропластов (Чиркова, 2002; Кошкин, 2010).

Основной мишенью действия мороза, как и других внешних повреждающих факторов, считают клеточные мембраны (Чиркова, 2002), в первую очередь плазмалемму (Красавцев, 1988). Низкая температура вызывает затверждение липидной части мембраны вследствие фазового перехода липидного бислоя из жидкокристаллического в гелеобразное состояние (Кузнецов и Дмитриева, 2011), что негативно сказывается на гидрофобных липид-белковых взаимодействиях и может приводить к денатурации мембранных белков. Отрицательные температуры нарушают работу K^+ -активируемых АТФаз плазмалеммы и тонопласта и механизм активного транспорта сахаров (Палта и Ли, 1983; Косулина и др., 2011). В результате нарушения активного транспорта ионов и за счёт повышения пассивной проницаемости мембран тонопласта и плазмалеммы начинается утечка сахаров и ионов из клеток в межклетники, среди которых доля ионов K^+ составляет 60% (Косулина и др., 2011). Нарушения в структурном комплексе цитоплазматического матрикса, тесно связанного с плазмалеммой, приводят к утрате компартментации ферментов и субстратов (Хохлова и др., 1997). Если структурные нарушения поверхности плазмалеммы превышают 2-3%, наступает лизис клеток (Трунова, 2007).

Чувствительность растений к низким температурам зависит от уровня оводнённости их тканей. Ткани с высоким содержанием воды легко повреждаются, тогда как сухие семена могут выносить температуры до -196°C (Кузнецов и Дмитриева, 2011). Некоторые растения могут без тяжёлых последствий переносить минусовые температуры, находясь в состоянии переохлаждения, которое не сопровождается образованием льда. При образовании льда в тканях растения могут погибнуть. Низкое содержание воды предохраняет ткани от льдообразования (Кошкин, 2010).

В связи с вышесказанным в настоящее время одной из важнейших сельскохозяйственных задач является решение проблемы холодо- и морозостойкости возделываемых культур посредством изучения низкотемпературного стресса и низкотемпературной адаптации (*закаливания*), которая повышает холодо- и морозоустойчивость растений.

Под *низкотемпературным стрессом* понимают всю совокупность ответных реакций растения, соответствующих его генотипу и проявляющихся на разных уровнях организации (от молекулярного до организменного), на действие холода или мороза.

Холодостойкость – способность растений выдерживать холод – низкие положительные температуры. У *холодостойких растений* при температуре $0-5^{\circ}\text{C}$ ещё наблюдается движение цитоплазмы (Кошкин, 2010), но они погибают после образования льда в тканях, когда температура опускается ниже 0°C .

Морозостойкость (включает в себя свойство холодостойкости) – способность растений выдерживать мороз – отрицательные температуры. *Морозостойкие растения* выживают при образовании межклеточного и внеорганного льда (Трунова, 2007).

Зимостойкость – устойчивость растений к комплексу условий зимнего периода, включающая в себя морозостойкость, а также устойчивость к выпиранию, выпреванию, вымоканию, снежной плесени, зимним оттепелям и т.д. (Дорофеев и др., 2004; Кузнецов и Дмитриева, 2011).

В настоящее время имеются данные о существовании генов и кодируемых ими белков, участвующих в формировании устойчивости к морозу. Таким образом, морозоустойчивость растений определяется генетически, скоростью снижения температуры и другими условиями, влияющими на характер льдообразования (Трунова, 2007; Кошкин, 2010). Дж. Левитт рассматривал два вида замерзания растений: *внеклеточное* (в межклетниках) и *внутриклеточное* (Левитт, 1983). Позднее был выделен ещё один вид льдообразования – *внеорганный* (Трунова, 2007).

При быстром понижении температуры (10 °C/мин) лёд может образовываться внутри клеток. Микроскопически внутриклеточное замерзание подразделяют на два типа: *вспышкообразное* – внезапное, приводящее к немедленному потемнению клетки, и *замедленное*, когда рост кристаллов льда в клетке ясно наблюдается (Асахина, 1983). Данный тип льдообразования в природе встречается редко, но всегда приводит к гибели растений, независимо от их температурной устойчивости (Самыгин, 1997), за счёт механического разрушения клеток (разрыва мембран) под влиянием кристаллов льда.

Внеорганный путь образования льда присущ только меристематическим тканям, не имеющим внеклеточных пространств, а также вакуолей, и поэтому менее оводнённым по сравнению с дифференцированными клетками. Такой путь льдообразования наблюдается, например, в нижних чешуях почек зимующих растений (Трунова, 2007).

Внеклеточное образование льда, которое возникает при медленном охлаждении 1-5 °C/мин и обеспечивает выживание растений в условиях мороза, характерно для большинства тканей зимующих растений (Трунова, 2007). Лёд в межклетниках начинает образовываться по типу *гетерогенной нуклеации* при температуре ниже 0 °C и наличии нуклеаторов любой природы. Так, нуклеатором льда в листьях озимой ржи является комплекс фосфолипида, углевода и белка, у которого имеются дисульфидные связи и отсутствуют сульфгидрильные группы (Brush et al., 1994). Сапрофитные бактерии, например *Erwinia herbicola* и *Pseudomonas syringae*, выступающие в роли нуклеаторов

льда, образуют мембрансвязанный комплекс, состоящий из белков, фосфатидилинозитолов и сахаров в виде глюкозамина, галактозы и маннозы (Kozloff et al., 1991).

При медленном снижении температуры ниже 0 °C у морозостойких растений запускаются механизмы, направленные на избегание внутриклеточного льдообразования, обеспечивающие образование льда за пределами клетки (Левитт, 1983). При этом большое значение имеет увеличение водной проводимости мембран, облегчающее выход воды наружу. Образующийся в межклетниках и клеточных стенках лёд оттягивает воду из клеток, изменяя их осмотические свойства, вследствие чего клетки испытывают сильное обезвоживание. Так, морозостойкая берёза в зимнее время теряет до 80% воды, а озимые злаки – до 50% (Красавцев, 1972). Помимо этого цитоплазма сжимается кристаллами льда. Превышение критического предела обезвоживания и сжатия может приводить к гибели клетки. Кристаллы льда вытесняют воздух из межклетников, поэтому замёрзшие листья становятся прозрачными (Асахина, 1983; Кошкин, 2010).

Внеклеточное льдообразование приводит к изменениям мембранной системы клетки. Активирующиеся морозом фосфолипазы, главная из которых фосфолипаза D (ФЛД) (Июшида, 1983; Welti et al., 2002; Du et al., 2010), вызывают дегградацию мембранных галакто- и фосфолипидов. Основными субстратами для ФЛД являются фосфатидилглицерин, фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин (Eyster, 2007). Показано, что разные виды ФЛД вносят различный вклад в устойчивость растений к действию отрицательной температуры. Наиболее значимыми для формирования морозоустойчивости являются ФЛД α и ФЛД δ . Установлено, что ФЛД α вызывает гидролиз фосфатидилхолина при замерзании, а его снижение и повышение фосфатидной кислоты в этих условиях является летальным для клетки. Потеря ФЛД α снижает вызванное замерзанием увеличение фосфатидной кислоты более чем на 50% и повышает выживаемость (Welti et al., 2002). ФЛД δ повышает морозоустойчивость (Li et al., 2004), связывая микротрубочки и взаимодействуя

с цитоскелетом (Li et al., 2004, 2008). Наряду с ФЛД при охлаждении активируется фосфолипаза С, которая за счёт диацилглицерол киназной активности приводит к образованию фосфатидной кислоты (Ruelland et al., 2002; Vergnolle et al., 2005).

Деацилирование фосфолипидов приводит к образованию свободных жирных кислот, которые могут становиться субстратами окисления (Чиркова, 2002). Вероятно, интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) при действии гипотермии прямо пропорциональна нарушениям, вызванным гипотермией, и обратно пропорциональна холодоустойчивости растений (Жиров и др., 1982; Лукаткин, 2002; Трунова, 2007; Кошкин, 2010). Повышение содержания малонового диальдегида – продукта неферментативного свободнорадикального ПОЛ наблюдали в листьях теплолюбивых растений при действии низкой положительной температуры (Лукаткин и др., 1995; Попов и др., 2005) и в листьях холодостойких растений при действии отрицательной температуры (Жиров и др., 1982). Холодостойкие растения при длительном действии закаливающих температур способны предотвращать развитие процессов ПОЛ при последующем действии отрицательных температур (Жиров и др., 1982; Синькевич и др., 2011). Снижение содержания продуктов ПОЛ в закалённых растениях было связано с активацией антиоксидантных ферментов (Синькевич и др., 2011).

Приведённые выше изменения, вызываемые низкотемпературным стрессом у незакалённых растений, могут достичь критических величин и явиться причиной гибели растений. Тогда как у закалённых растений эти изменения обратимы и не достигают критических значений. На рисунке 1 представлены механизмы, лежащие в основе повреждений, вызываемых внеклеточным льдообразованием, в клетках незакалённых и закалённых к морозу растений (Трунова, 2007).

СХЕМА ПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТОК ПРИ ВНЕКЛЕТОЧНОМ ОБРАЗОВАНИИ ЛЬДА



Рис. 1. Повреждения клеток, вызываемые внеклеточным льдообразованием (Трунова, 2007)

Обозначения: ПОЛ – перекисное окисление липидов; ФПЛ – фазовый переход липидов.

1.2. МЕХАНИЗМЫ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ЗАКАЛИВАНИЯ ТРАВЯНИСТЫХ РАСТЕНИЙ

Низкотемпературная адаптация (закаливание) – процесс приобретения растением обратимой физиологической устойчивости (холодо- или морозостойкости) в условиях, соответствующих генотипу данного растения.

Таким образом, согласованная совокупность физиологических и биохимических изменений, имеющая сложную генетическую основу и происходящая в процессе низкотемпературной адаптации, определяет устойчивость растений к отрицательным температурам (Heidarvand and Maali Amiri, 2010). При холодной адаптации проявляется неспецифическая устойчивость, поэтому закаливание к одному агенту может повышать устойчивость и к другим стрессорам – сопряжённая устойчивость, или кросс-

устойчивость/кросс-адаптация (Медведев, 2004). Так, холодное закаливание озимой пшеницы увеличивает её устойчивость и к гипоксии, которая возникает при образовании на посевах ледяной корки (Чиркова, 2002), а также повышает тепло-, соле- и металлоустойчивость (Титов и др., 2006).

Процесс закаливания должен обеспечить отток воды из клеток через мембраны (для предупреждения внутриклеточного льдообразования) и в то же время защитить клетки от действия обезвоживания (Касперска-Палач, 1983). В природе к закаливанию способен лишь организм в целом, при обязательном наличии корневой системы. Для формирования низкотемпературной адаптации закаливающие температуры должны предшествовать повреждающим температурам. Для закаливания морозостойких растений эффективны околонулевые температуры, для холодостойких – 3-5 °С, а для теплолюбивых выше 5 °С. *Теплолюбивые растения* повреждаются температурами ниже 8-10 °С, а их длительное пребывание при температурах немного выше 0 °С чревато сильными повреждениями и даже гибелью. Теплолюбивые растения адаптируются к ограниченному диапазону действия пониженных температур (Трунова, 2007).

Эффективному закаливанию озимых культур способствуют такие агрометеорологические факторы, как прямая солнечная радиация, большая суточная амплитуда температуры, оптимальная влажность почвы. Окончание периода закаливания играет важную роль для формирования зимостойкости, успешное закаливание определяет выживаемость растений в поздний зимний и ранний весенний периоды (Пыйклик, 1963). Теорию поэтапного повышения устойчивости растений к низким температурам в нашей стране предложил И. И. Туманов (Туманов, 1979). В естественных условиях этот процесс начинается в осенний период и запускается сокращением длины светового дня, понижение температуры на данном этапе играет второстепенное значение. Фитохром участвует в рецепции освещённости, в активации генов, кодирующих белки, связанные с переходом в состояние покоя (Касперска-Палач, 1983; Чиркова, 2002). На растениях огурца (дикого типа и дефицитного по фитохрому В)

показано, что фитохром В способствует развитию холодоустойчивости растений при краткосрочном периодическом низкотемпературном воздействии ночью (Сысоева и др., 2013). В этот период функционирование фотосинтеза не прекращается, при этом изменяется гормональный баланс клеток. Снижается содержание ауксинов и гиббереллинов (ГБ) и значительно повышается концентрация АБК, что приводит к приостановке роста апикальных меристем (Чиркова, 2002; Kosová et al., 2012). Благодаря этому многолетние растения входят в состояние глубокого (органического) покоя, а травянистые, например озимые злаки, – в вынужденный. Их ткани, несмотря на вынужденную приостановку роста, сохраняют способность к нему на протяжении всей зимы. У видов травянистых растений, способных к закаливанию, надземные ткани переносят температуру до $-20...-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ после предварительного воздействия закалывающих условий (Касперска-Палач, 1983). Выделяют следующие фазы закаливания растений (Туманов, 1979; Касперска-Палач, 1983):

I фаза закаливания, подробно изученная Н.А. Максимовым (Максимов, 1952) и И.И. Тумановым (Туманов, 1979), протекает на свету, при низких положительных температурах (в ночное время около $2\text{ }^{\circ}\text{C}$) и умеренной влажности почвы. I фаза закаливания может протекать и в темноте, если растения выращиваются на растворе сахарозы или если они не исчерпали запасные вещества эндосперма или семядолей. Прекращение роста растений и их переход в состояние покоя – необходимые условия прохождения I фазы закаливания. Накапливающаяся в тканях АБК не только ингибирует ростовые процессы, но и увеличивает проницаемость мембран для воды, способствуя быстрому её оттоку в межклетники, что снижает опасность внутриклеточного льдообразования (Касперска-Палач, 1983; Косулина и др., 2011; Shinkawa et al., 2013). Увеличение содержания АБК приводит к формированию устойчивости к пониженным температурам как теплолюбивых, так и холодостойких растений (Титов и Таланова, 2011; Perales et al., 2005; Kosová et al., 2012). Низкотемпературное закаливание теплолюбивых (огурец) и холодостойких (пшеница) растений в лабораторных условиях выявило два пика накопления АБК: на начальном этапе

закаливания (в течение нескольких часов) и через несколько суток закаливания, когда устойчивость была практически сформирована (Титов и Таланова, 2009). Заметный прирост холодоустойчивости и максимальное содержание АБК совпадали по времени. Затем содержание АБК снижалось, а устойчивость продолжала монотонно возрастать ещё в течение нескольких суток. Также было показано, что увеличение содержания АБК при закаливании происходит как за счёт перехода гормона из связанного состояния в свободное, так и за счёт его синтеза (Косулина и др., 2011; Титов и Таланова, 2011). Повышение концентрации АБК при закаливании приводило к экспрессии АБК-зависимых генов белков, отвечающих за холодоустойчивость (Шакирова и др., 2009; Таланова и др., 2011; Титов и Таланова, 2011; Theocharis et al., 2012). Кроме этого АБК влияет на метаболизм водорастворимых углеводов и активность ферментов, участвующих в их накоплении при закаливании (Kerepesi et al., 2004; Liu et al., 2013).

Озимые злаки проходят I фазу закаливания при среднесуточной температуре 0,5-2 °C за 6-9 дней, древесные – за 30 дней. Количество сахаров у озимых растений возрастает до 22% на сырую массу (Кошкин, 2010) или до 40-60% на сухую массу (Косулина и др., 2011), накапливаются сахароза и другие олигосахариды (Кошкин, 2010). Считается, что увеличение содержания сахаров происходит, например, при гидролизе крахмала, который стимулируется низкими положительными температурами (Касперска-Палач, 1983). Помимо изменения в содержании сахаров при гипотермии накапливаются и другие осмолиты, например пролин (Колупаев и др., 2015; Hare et al., 1999), происходит увеличение содержания водорастворимых белков (Trunova et al., 1997), ненасыщенных жирных кислот и общих мембранных липидов (Верещагин, 2007; Макаренко и др., 2010; Попов и др., 2012), мембранных элементов клетки (Трунова и Астахова, 1998). Изменение в содержании липидов связывают с активностью ФЛД, активность которой увеличивается при гипотермии (Касперска-Палач, 1983). Морозоустойчивость пшеницы после I фазы закаливания повышается с –5 до –12 °C (Туманов, 1979).

II фаза закаливания была подробно изучена О.А. Красавцевым (Красавцев, 1972) и И.И. Тумановым (Туманов, 1979). Она не требует света, инициируется температурой немного ниже 0 °С. В это время начинается процесс внеклеточного образования льда (в межклетниках), которому способствует сохраняющаяся высокая водная проводимость мембран и наличие нуклеаторов льда в апопласте (Трунова, 2007). Обезвоживание клеток приводит к увеличению концентрации солей, которые оказывают негативное действие на биокolloиды клеток. Поэтому у растений повышается экзоосмос зольных веществ, которые в большем количестве выделяются морозостойкими растениями, чем неморозостойкими. Помимо этого у морозостойких растений происходит переход цитоплазмы протопласта в форму геля (гелификация) за счёт накопления водорастворимых белков и образования полимерных волокнистых структур в цитоплазме и вакуоли. Гелификация предотвращает внутриклеточное льдообразование и делает содержимое клетки менее инертным, что предотвращает сдвиги в метаболизме (Косулина и др., 2011). Отрицательные температуры, помимо оказываемых физических (льдообразование, обезвоживание клеток) эффектов, влияют на некоторые метаболические процессы. Например, отрицательная температура необходима для гидролиза олигосахаридов травянистых и древесных растений до ди- и моносахаридов (Касперска-Палач, 1983; Косулина и др., 2011). Длится II фаза около 2 недель (травянистые растения могут проходить её под снегом) при постепенном снижении температуры со скоростью 2-3 °С в сутки до -10...-20 °С и ниже. При этом в растениях уменьшается содержание свободной воды, происходит витрификация (переход воды в стеклообразное состояние). II фаза закаливания повышает морозоустойчивость пшеницы до -18...-20 °С, а ржи – до -20...-25 °С (Касперска-Палач, 1983; Кошкин, 2010; Косулина и др., 2011).

Устойчивость к температурному стрессу имеет комплексную природу и находится под генетическим контролем. При этом происходят существенные изменения общего метаболизма. Происходит накопление веществ-криопротекторов (водорастворимые углеводы, аминокислоты, полиамины,

неферментные белки) (Климов и др., 2010; Guy, 1990; Szalai et al., 2009; Theocharis et al., 2012). Меняются физиологические свойства мембран и изоферментный состав белков, усиливается синтез неспецифических и специфических белков холодового шока, изменяется соотношение между интенсивностью фотосинтеза и дыхания, происходит торможение или прекращение роста растений (Климов, 1998; Чиркова, 2002; Колесниченко и Войников, 2003; Климов и др., 2010; Gulick et al., 2005; Vítamvás et al., 2012). На рисунке 2 представлена общая схема процессов, протекающих в период низкотемпературного закаливания растений (Трунова, 2007).

ПРОЦЕССЫ, СВЯЗАННЫЕ С НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ АДАПТАЦИЕЙ

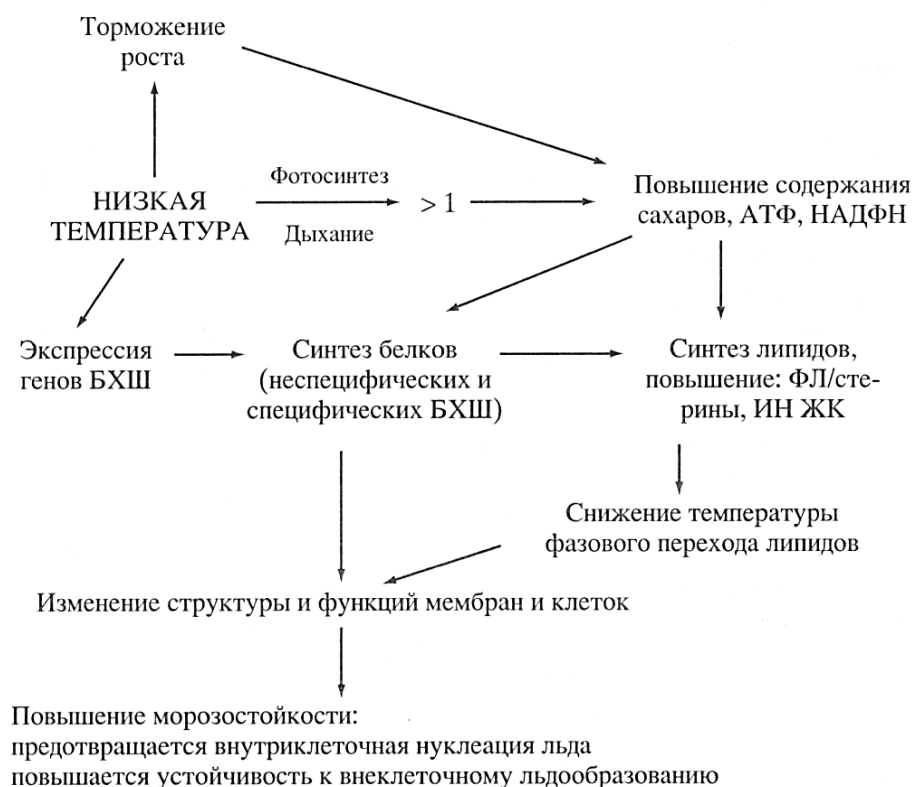


Рис. 2. Схема процессов при низкотемпературной адаптации (Трунова, 2007)

Обозначения: АТФ – аденозин-5'-трифосфат; ИН ЖК – индекс ненасыщенности жирных кислот; ФЛ – фосфолипиды; НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный; БХШ – белки холодового шока.

1.2.1. Ингибирование роста

Процесс закаливания в естественных условиях возможен лишь на определённых этапах развития растений. Для формирования закалённого состояния растения должны закончить процессы роста. Ингибирование растяжения клеток приводит к снижению оводнённости тканей, что уменьшает вероятность внутриклеточного льдообразования (Касперска-Палач, 1983). Таким образом, вхождение в покой является необходимым условием для последующей холодовой адаптации растений. Первостепенную роль в запуске процессов закаливания играет длина фотопериода. Сокращение длины светового дня является сигналом к прекращению роста растений, накоплению ингибиторов и началу формирования устойчивости к неблагоприятным температурам (Туманов, 1979; Кошкин, 2010).

Выявлено, что низкие положительные температуры вызывают в растениях изменение гормонального статуса в сторону уменьшения синтеза фитогормонов и негормональных стимуляторов роста и увеличения синтеза ингибиторов роста (АБК, этилен, жасмоновая кислота), что приводит к торможению роста клеток растений растяжением и переходу их в состояние покоя (Касперска-Палач, 1983; Лукаткин, 2002; Трунова, 2007; Кузнецов и Дмитриева, 2011; Титов и Таланова, 2011). Так, в I фазу закаливания происходит увеличение содержания эндогенной АБК, повышенная концентрация которой коррелирует с холодоустойчивостью (Касперска-Палач, 1983; Pagter et al., 2008). АБК вызывает приостановку роста апикальных меристем (Чиркова, 2002).

1.2.2. Изменение липидного и жирнокислотного состава

Структурную основу мембран плазмалеммы составляют полярные липиды с преобладанием фосфолипидов (ФЛ). Среди них доминируют фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин. Среди жирных кислот (ЖК) мембран наибольшее содержание имеют пальмитиновая 16:0, линолевая 18:2^{Δ9,12} и линоленовая 18:3^{Δ9,12,15} кислоты (Кошкин, 2010). Липидные компоненты мембран наиболее чувствительны к действию низких положительных и отрицательных температур,

что выражается в повышении общего содержания мембранных липидов, в большей степени фосфатидилхолинов (Yoshida and Sakai, 1973; Wang et al., 2006). Фитохелатины и дигалактозилдиацил глицерины при низких температурах стабилизируют бислойную структуру мембран, так как имеют более низкую температуру фазового перехода по сравнению с фосфатидилэтаноламином при сильной дегидратации внутриклеточных мембран, вызванной внеклеточным льдообразованием (Кошкин, 2010). Увеличение общего содержания мембранных липидов приводит к повышению отношения полярных липидов к белкам, так, в листьях озимой пшеницы и ржи после закаливания отношение липиды/белки мембран увеличилось в 1,2-1,3 раза (Климов и др., 1993). Выявлено, что при фазовом переходе мембранных липидов под действием гипотермии происходит экспрессия нескольких групп генов, кодирующих киназы гистидина, РНК-связывающие белки, РНК-хеликазы (Inaba et al., 2003).

Плазмалемма, в отличие от других мембран клетки, содержит стерины, которые обеспечивают пониженную текучесть. В условиях гипотермии происходит снижение содержания стерина и сфинголипидов (Minami et al., 2010), а также увеличение соотношения фосфолипиды/стерины, что уменьшает вязкость мембран и снижает температуру их термотропных переходов (Климов и др., 1993; Трунова, 2007; Кошкин, 2010). Термотропные свойства мембранных фосфолипидов, определяющиеся степенью ненасыщенности входящих в их состав ЖК, имеют большое значение для поддержания структуры и функциональной активности мембран (Трунова, 2007). Особенно много полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) при закаливании накапливается в мембранах митохондрий и хлоропластов (Климов, 2001).

На мутантах арабидопсиса было показано, что недостаточное содержание ПНЖК приводит к недоразвитости ультраструктуры хлоропластов и хлорозу листьев при гипотермии и нормальных температурах (Hugly and Somerville, 1992). В процессе низкотемпературной адаптации как у теплолюбивых, так и у холодостойких растений увеличивается содержание ненасыщенных жирных

кислот (ННЖК) мембранных липидов, что повышает текучесть мембран (Касперска-Палач, 1983; Шаяхметова и др., 1990; Новицкая и др., 1990, 2000; Верещагин, 2007; Макаренко и др., 2010; Попов и др., 2012; Miller et al., 1974).

Температуры плавления ЖК C₁₈-ряда: олеиновой 18:1^{Δ9}, линолевой 18:2^{Δ9,12} и линоленовой 18:3^{Δ9,12,15} равны 13,4, -8...-9 и -16...-17 °С, соответственно (Досон и др., 1991), поэтому чем больше двойных связей в жирнокислотных хвостах липидов, тем ниже температура фазового перехода и выше способность мембран нормально функционировать в области пониженных температур (Левитт, 1983; Хочачка и Сомеро, 1988; Верещагин, 2007).

При гипотермии увеличивается содержание ННЖК, преимущественно полиненасыщенной α-линоленовой (Vereshchagin et al., 1990), так, в листьях озимых злаков на неё приходится 72% от всех жирных кислот (Климов и др., 1993). Благодаря α-линоленовой кислоте повышается текучесть липидного бислоя мембран и предотвращается фазовое разделение липидов под действием низких температур (Верещагин, 2007). Помимо этого α-линоленовая кислота является необходимым компонентом мембран хлоропластов и способствует функционированию фотосинтетического аппарата при гипотермии (Марковская и др., 2013). Таким образом, увеличение содержания α-линоленовой кислоты коррелирует с увеличением холодо- и морозоустойчивости и поддерживает фотосинтетические процессы на более высоком уровне (Liu et al., 2008). При закаливании озимой пшеницы в большей степени накапливалась α-линоленовая кислота, при этом соотношение C_{18:3} / (C_{18:1} + C_{18:2}) увеличивалось в среднем с 4 до 6. У озимых злаков повышение содержания ННЖК происходило уже через 15 мин после действия закалывающей температуры 2 °С (Новицкая и др., 1990). При низкотемпературном закаливании теплолюбивых растений табака наблюдалось повышение относительного содержания ПНЖК (18:2n-6 и 18:3n-3) в листьях на фоне снижения содержания насыщенных (НЖК) и мононенасыщенных жирных кислот, что значительно повышало холодостойкость листьев растений. В корнях растений табака закаливание не приводило к такому эффекту, что говорит о низкой холодостойчивости корневой системы табака (Попов и др., 2012).

Увеличение доли ННЖК происходит при десатурации НЖК, которую осуществляют ацил-липидные десатуразы (Тарчевский, 2001; Nishida and Murata, 1996; Murata and Los, 1997). Предполагается, что экспрессия генов десатураз индуцируется уменьшением текучести клеточных мембран вследствие снижения температуры окружающей среды (рис. 3).

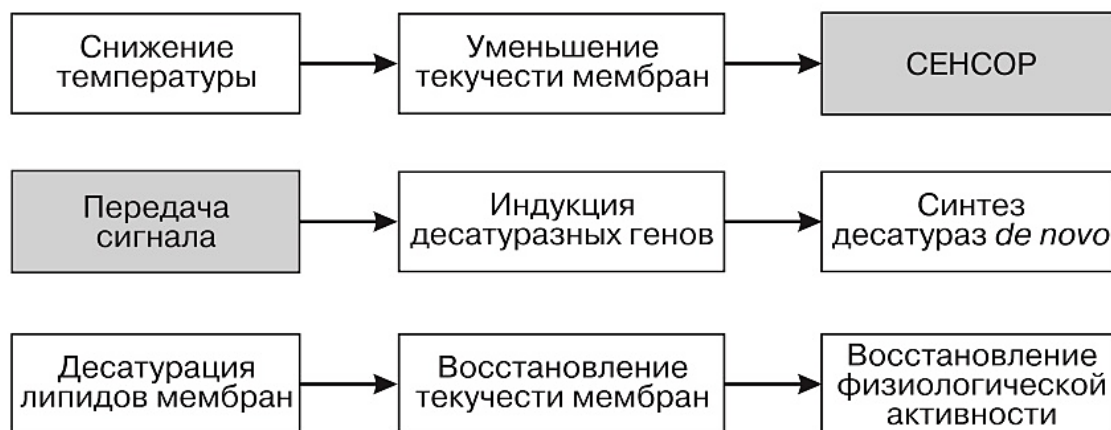


Рис. 3. Схема адаптации клетки к понижению температуры (Лось, 2001)

Показано, что экзогенная АБК приводит к увеличению активности десатураз, а совместная с низкотемпературным закаливанием обработка АБК ещё в большей степени усиливает десатурацию (Bakht et al., 2006).

Активация $\Delta 9$ -ацил-липидных десатураз способствует повышению устойчивости клеточных мембран и растений в целом к действию низкой температуры (Ishizaki-Nishizawa et al., 1996). Первая двойная связь в $\Delta 9$ -положении ЖК, определяющая жидкостные свойства липидов, появляется в жирных кислотах в липид-связанной форме. Показано, что первая двойная связь в ЖК некоторых высших растений образуется не только в $\Delta 9$ -положении, как у цианобактерий, но и в $\Delta 4$ - и $\Delta 6$ -положениях (Лось, 2001). Кроме этого у растений обнаружены ацил-липидные $\Delta 7$ - и $\omega 7$ -десатуразы (Лось, 2014).

Десатуразы высших растений делятся на растворимые ацил-АПБ-десатуразы (АПБ – ацил-переносящий белок) и мембранные ацил-липидные десатуразы (Лось, 2001, 2014). Образование олеиновой кислоты $18:1^{\Delta 9}$ происходит в строме хлоропластов, а её десатурация в липид-связанной форме осуществляется в мембране хлоропластов и эндоплазматического ретикулума,

куда олеиновая кислота транспортируется с помощью АПБ. После окончания десатурации липиды, содержащие ПНЖК, могут транспортироваться в плазмалемму. Из семян *Arabidopsis thaliana* и лепестков розы были клонированы гены ацил-липидных $\Delta 9$ -десатураз непластидной локализации, таким образом, десатурация ЖК в мембранах клеток растений возможна и без участия ацил-АПБ-десатураз (Лось, 2001, 2014).

В настоящее время известны гены некоторых десатураз цианобактерий (Лось, 1997, 2001, 2014; Los and Murata, 1998), часть из них экспрессируется гипотермией, экспрессия других не зависит от температуры (рис. 4).

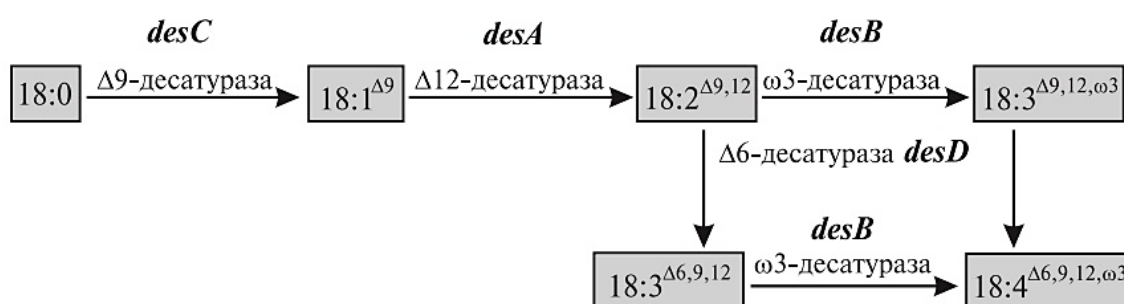


Рис. 4. Общая схема десатурации жирных кислот ацил-липидными десатуразами в цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Лось, 2001)

Обозначения: *desA*, *desB*, *desC*, *desD* – названия генов, кодирующих указанные на рисунке десатуразы ($\Delta 12$ -, $\omega 3$ -, $\Delta 9$ -, $\Delta 6$ -десатуразы, соответственно).

Экспрессия гена *desC* (кодирует синтез $\Delta 9$ ацил-липидной десатуразы, превращающей стеариновую кислоту 18:0 в олеиновую 18:1 $^{\Delta 9}$) не зависит от температуры. Гены *desA* и *desB*, кодирующие десатуразы, участвующие в образовании линолевой 18:2 $^{\Delta 9,12}$ кислоты из олеиновой 18:1 $^{\Delta 9}$ и α -линоленовой 18:3 $^{\Delta 9,12,15(\omega 3)}$ из линолевой 18:2 $^{\Delta 9,12}$, экспрессируются при пониженных температурах (Лось, 2001, 2014). Причём эти температуры несколько выше температуры фазового перехода липидов из жидкокристаллического состояния в гель, что предотвращает повреждения и гибель растений при похолодании. Трансформация растений табака геном $\Delta 9$ ацил-липидной десатуразы из термофильной бактерии *Synechococcus vulcanus* приводила к увеличению индекса ненасыщенности ЖК и появлению более холодостойкого фенотипа растения (Попов и др., 2005; Orlova et al., 2003). Аналогичные результаты были

получены на растениях картофеля при использовании гена *desA* $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы цианобактерии *Synechocystis* sp. Помимо этого у растений наблюдалась стабилизация структуры и функций мембран хлоропластов, сохранение интактности сопрягающих мембран, снижалась генерация активных форм кислорода при гипотермии (Астахова и др., 2011; Дёмин и др., 2013).

Экспрессия генов десатураз высших растений изучена мало. Известно, что ген *fad8* (кодирует $\omega 3$ -десатуразу хлоропластов *A. thaliana*) активируется низкими температурами (Лось, 2001, 2014).

На культуре клеток арабидопсиса с выключенной экспрессией гена *fad2*, кодирующего десатуразу FAD2, которая превращает олеиновую кислоту 18:1 ^{$\Delta 9$} в линолевую 18:2 ^{$\Delta 9,12$} , и клеток, сверхэкспрессирующих ген *fad3*, кодирующий десатуразу FAD3, превращающую линолевую кислоту 18:2 ^{$\Delta 9,12$} в α -линоленовую 18:3 ^{$\Delta 9,12,15(\omega 3)$} , было показано, что изменение содержания ПНЖК определяет холодоустойчивость клеток (Matos et al., 2007). Низкое содержание ПНЖК и сниженное отношение белок/липид в митохондриях, изолированных из *fad2* мутантов, сопровождалось снижением холодоустойчивости, в то время как более высокое содержание α -линоленовой кислоты и повышение отношения белок/липид в митохондриях из *FAD3+* мутантов приводили к повышенной устойчивости клеток арабидопсиса к низкой температуре. При этом снижение степени ненасыщенности ЖК в митохондриальных мембранах приводило к нарушению процесса окислительного фосфорилирования в митохондриях (Matos et al., 2007).

Увеличение содержания ПНЖК мембранных липидов, повышая текучесть мембран, также улучшает их проницаемость для воды, что может приводить к сильному обезвоживанию растений особенно при недостатке влаги в почве. Накопление водорастворимых белков и осмотически активных веществ (простые сахара, органические кислоты, пролин) с самого начала закаливания защищает растения от вторичного влияния изменений проницаемости мембран, вызванных низкой температурой (Касперска-Палач, 1983).

1.2.3. Синтез стрессовых белков

Обезвоживание клеток растений, вызываемое образованием льда в межклетниках при гипотермии, оказывает сильное влияние как на структурные, так и водорастворимые белки растительных клеток. Обезвоживание, главным образом, разрушительно действует на гидрофобные связи, которые играют основную роль в поддержании структурной и функциональной активности белка. В результате может происходить денатурация вторичной и третичной структур, деформация и агрегация белков (Bock and Frieden, 1978). Считается, что водорастворимые белки обладают большей устойчивостью к низким температурам, по сравнению со структурными белками, поскольку имеют меньшее количество гидрофобных связей (Heber, 1967).

В свою очередь гидрофильные группировки белков (сульфгидрильные и другие) способствуют удержанию воды и препятствуют сильному сближению и агрегации белковых молекул, обуславливают вязкость и эластичность протоплазмы (Ли и Палта, 1983). Наличие в клетках растений белков с большим количеством сульфгидрильных групп положительно влияет на их морозоустойчивость (Трунова, 2007; Косулина и др., 2011).

Встроенные в мембраны структурные белки более чувствительны к действию низких температур. Мембранные системы стабилизируются гидрофобными связями липидных компонентов, водородными связями между белками и водой. Обезвоживание клеток нарушает эти связи, вызывая инактивацию белков, изменения структуры и проницаемости мембран (Трунова, 2007; Takahashi et al., 2013).

Во время низкотемпературной адаптации у растений происходят значительные морфофункциональные перестройки, связанные с изменением экспрессии генов, отвечающих за синтез особых стрессовых белков, и прекращением (сокращением) синтеза ряда обычных белков (Титов и др., 2006). Данный процесс называют «индуцированное репрограммирование клеток» (Arnholdt-Schmitt, 2004). Например, в клетках растений при гипотермии

экспрессируется целое семейство генов – *cor*-гены (англ. “cold regulated genes”), которые кодируют COR-белки (Guy et al., 1985; Thomashow, 1998; Ishibashi et al., 2007; Heidarvand and Maali Amiri, 2010). Активация *cor*-генов происходит за счёт временного увеличения концентрации Ca^{2+} в цитозоле в ответ на действие низких температур (Lissarre et al., 2010). Большая часть COR-белков – это низкомолекулярные высоко гидрофильные и термоустойчивые белки, не обладающие ферментативными свойствами. Предполагают, что белки COR 15a (кодируемые геном *cor 15am*) участвуют в формировании морозостойкости, поскольку предотвращают переход мембран из ламеллярной в гексагональную фазу, который происходит при сильном (более 50%) обезвоживании мембран (Трунова, 2007; Webb et al., 1996). Аналогичный белок пшеницы COR15, кодируемый геном *Wcor15*, повышает криостабильность плазмалеммы и мембран хлоропластов (Takumi et al., 2003).

Доказано, что при низкой адаптирующей температуре происходит экспрессия генов стрессовых белков – белков холодового шока (англ. “Cold Shock Proteins”) (Guy, 1990). В отношении большинства исследуемых видов растений при закаливании отмечается увеличение содержания водорастворимых белков (Браун, 1983; Климов и др., 1993). На необходимость синтеза белка при низкотемпературной адаптации указывают результаты, полученные при проведении экспериментов с циклогексимидом (ингибитором биосинтеза белка). Обработанные циклогексимидом закалённые растения пшеницы погибали после действия температурой -7°C даже на фоне высокого содержания сахаров, тогда как контрольные закалённые растения выдерживали промораживание при -16°C (Трунова и Зверева, 1977). Аналогичные результаты были получены при использовании специфических ингибиторов белкового синтеза на растениях томата, огурца и пшеницы (Титов и др., 1982, 2006).

Охлаждение некоторых теплолюбивых растений (кукурузы, риса, томата, огурца, арахиса, хлопчатника, подсолнечника) индуцирует синтез от одного до двадцати полипептидов с молекулярной массой от 14 до 94 кДа, у более холодостойких сортов изменения в наборе транслируемых белков выражены

сильнее (Кошкин, 2010). Понижение температуры индуцирует синтез таких белков, как дегидрины (Hanin et al., 2011), алкогольдегидрогеназа (Davik et al., 2013), убиквитин, ферменты метаболизма фенилпропаноидов, альтернативные оксидазы (González-Meler et al., 1999), Ca^{2+} -зависимые протеинкиназы и др. (Кошкин, 2010).

Специфическими белками холодового шока озимой пшеницы являются белки WCSP1 (англ. “Wheat Cold Shock domain Protein 1”), локализованные в митохондриях, ядре и цитозоле. Накопление WCSPs при холодовом закаливании происходит в меристематических тканях побегов (Radkova et al., 2014).

Белки, гены которых экспрессируются под действием низкой температуры, представлены также ферментами и изоферментами анаболизма и катаболизма, поддерживающими в течение зимы основной метаболизм растений (Трунова, 2007). Активность различных ферментов при закаливании повышается, ферменты становятся более стабильными, температура их инактивации снижается (Лэмб, 1970). В результате поддерживается интенсивность синтетических процессов, например синтез ННЖК, для которого необходимо достаточное количество НАДФ·Н, поставляемого пентозофосфатным путем (ПФП), который активируется в условиях гипотермии (Чиркова, 2002).

Показано, что при холодовой акклимации растений происходит существенное увеличение активности такого антиоксидантного фермента, как каталаза (гемсодержащего фермента, катализирующего разложение пероксида водорода до воды) и снижение холодового повреждения (Синькевич и др., 2011; Колупаев и др., 2015). Уровень активности каталазы при гипотермии является видоспецифичным (большую роль данный фермент играет в защите теплолюбивых растений), также активность этого фермента зависит от фазы развития растения, продолжительности действия гипотермии и освещённости – на свету происходит фотоингибирование его активности (Кошкин, 2010). При гипотермии увеличивается активность и других антиоксидантных ферментов – пероксидаз (Prasad et al., 1995; Синькевич и др., 2011; Колупаев и др., 2015), супероксиддисмутазы (Синькевич и др., 2011; Нарайкина и др., 2014) и

изопероксидазы (Савич, 1989), а также других ферментов: гликозидазы (Барышева и др., 1999), протеиназы и карбоксипептидазы (Вовчук и др., 1991), пептидгидролазы (Вовчук и др., 1994), цистеиновых протеиназ, амидаз и ингибиторов трипсина (Фролова и др., 2011), НАДФ·Н-оксидазы (Пиотровский и др., 2011).

Внутриклеточному образованию льда при закаливании растений препятствуют следующие соединения белковой природы:

1. *Аквапорины.* Накопление массовой доли аквапоринов (специализированных белков водных каналов) происходит при действии низких закаливающих температур. Установлено, что аквапорины являются АБК-зависимыми белками (Parent et al., 2009). В растительной клетке может содержаться множество изоформ белков-аквапоринов (Хелдт, 2011). По локализации данные белки подразделяют на аквапорины плазмалеммы и тонопласта. Аквапорины встраиваются в мембраны, образуя в липидном бислое водные поры. Полипептидная цепь каждой субъединицы аквапорина образует шесть трансмембранных α -спиралей. В мембране четыре субъединицы объединяются в тетрамер, в котором каждый мономер формирует канал для воды (Кузнецов и Дмитриева, 2011; Хелдт, 2011). Благодаря гидрофильности внутренних поверхностей молекул аквапоринов (Кузнецов и Дмитриева, 2011), данные белки облегчают выход воды из клеток в межклетники, способствуя внеклеточному льдообразованию (Трунова, 2007).

2. *Антифризные белки.* Наличие антифризных белков в закалённых растениях было выявлено в опытах по секвенированию аминокислот экспрессируемого холодом белка гена *kin I* (Kurkela and Frank, 1990). Антифризная активность имеет сезонный характер (возрастает к зиме и снижается весной) и присуща всем органам растений (Duman and Olsen, 1993). При холодовой акклиматизации антифризные белки секретируются в апопласт, адсорбируются на поверхности мелких кристаллов льда, влияя на их морфологию и размер, подавляя их рост, препятствуя рекристаллизации (Knight and Duman, 1986; Gupta and Deswal, 2014). Предотвращая, таким образом,

повреждения, оказываемые кристаллами льда, они выступают в качестве белков-криопротекторов клеточных мембран. Также антифризные белки осуществляют термальный гистерезис в пределах 0,1-0,7 °С, вследствие которого температуры замерзания и таяния льда не совпадают. Есть предположение, что антифризные белки, обладая неколлагативными свойствами, могут способствовать переохлаждению и снижать точку замерзания растворов, связывая нуклеаторы льда (Хочачка и Сомеро, 1988; Трунова, 2007). В настоящее время идентифицированы антифризные белки, локализующиеся в апопласте озимой ржи – 13, 19, 26, 32, 34 и 36 кДа и некоторых видов пшениц – *TaIRI-1* (англ. “*Triticum aestivum* Ice Recrystallization Inhibition”) (Winfield et al., 2010). Антифризные белки поддерживаются внутримолекулярными дисульфидными связями, состоят из таких аминокислот, как аргинин, пролин (Thomashow, 1998), глицин, и связаны с углеводными компонентами типа галактозы (Knight et al., 1993; Duman, 1994).

3. *Дегидрины*. Дегидрины относятся к семейству COR-белков, II (III) группе LEA-белков (англ. “Late Embryogenesis Abundant”) – белков позднего эмбриогенеза (впервые обнаружены в хлопчатнике на поздней стадии эмбриогенеза). Экспрессия генов дегидринов происходит под действием пониженных/повышенных температур, водного стресса, засоления, АБК (основного гормона, накапливающегося в период наибольшего повышения морозостойкости растений) – в этом случае дегидрины называют RAB-белками (англ. “Responsive to ABA”) (Аллагулова и др., 2003; Thomashow, 1999; Rorat, 2006; Hanin et al., 2011). Дегидрины представляют собой высокогидрофильные термостабильные белки с молекулярной массой от 9 до 200 кДа, которые содержат консервативные K-, Y-, S-сегменты (Close, 1996) и Ø-сегмент (Ingram and Bartels, 1996). Благодаря своей гидрофильности и шапероноподобной активности (Goyal et al., 2005; Kovacs et al., 2008) дегидрины предотвращают деградацию и коагуляцию ряда макромолекул клеточных структур при обезвоживании их внеклеточным льдом (Skriver and Mundy, 1990; Close, 1997; Goyal et al., 2005). Наблюдается связь между увеличением содержания

дегидринов и снижением оводнённости тканей (Пономарев и др., 2014), что в свою очередь снижает риск внутриклеточного льдообразования (Guy et al., 1992). Кроме того, дегидрины проявляют криопротекторную, антифризную и антиоксидантную активности, а также могут связывать ионы металлов (Rorat, 2006; Hara, 2010; Hanin et al., 2011). Локализуются дегидрины в различных компартментах клетки (вблизи плазмалеммы, в цитоплазме, ядре, вакуоли, митохондриях) и синтезируются в эмбриональных или в вегетативных тканях растений (Романенко и др., 2010; Borovskii et al., 2002; Rorat, 2006; Rurek, 2010).

Закаливание при низкой положительной температуре (4 °C, семь суток), которое увеличивало устойчивость арабидопсиса к заморозкам, сопровождалось повышением содержания дегидрина с молекулярной массой 70 кДа, а также ряда белков теплового шока (БТШ101 и БТШ60). Учитывая, что БТШ101 необходим для растворения агрегатов частично денатурировавших при стрессе белков, предполагается, что повышенная способность к ренатурации полипептидов является важной частью программы адаптации растений арабидопсиса к отрицательным температурам (Гамбург и др., 2014).

Наиболее высокое содержание дегидринов, связанных с развитием морозоустойчивости древесных и травянистых растений, приходится на зимний период (Бубякина и др., 2011; Поморцев, 2013; Татарина и др., 2013), предположительно за формирование морозоустойчивости древесных растений отвечают низкомолекулярные дегидрины (Петров и др., 2011; Пономарев и др., 2014).

Формирование холодоустойчивости у озимой и яровой пшеницы при краткосрочном воздействии низких температур связано с усилением экспрессии АБК-зависимых (*Wrab17* и *Wrab19*) (Tsuda et al., 2000; Sun et al., 2009) и АБК-независимых (*Wcor15* и *Wcs120*) (Takumi et al., 2003; Kume et al., 2005) *cor*-генов. При длительном воздействии низкой температуры (семь суток) формирование устойчивости связано с экспрессией генов *Wcor15* и *Wrab17* (Таланова и др., 2011; Титов и Таланова, 2011).

Для озимых пшениц важны холодо-индуцибельные дегидриноподобные белки групп WCS120 (англ. “Wheat Cold Specific”) и WCOR410 (англ. “Wheat COLD Regulated”) (Danyluk et al., 1998; Kosová et al., 2012). Белки группы WCOR410 богаты лизином и глутаминовой кислотой. Они локализируются преимущественно в сосудистой области перехода корней, листьев и узлов кущения и представляют собой периферические белки, накапливающиеся в непосредственной близости от плазмалеммы и защищающие её от дегидратации (Danyluk et al., 1998) благодаря своей гидрофильной природе (Ingram and Bartels, 1996; Israelachvili and Wennerström, 1996). Группа белков WCS120 (семейство WCS с молекулярной массой от 12 до 200 кДа) локализуется в цито- и нуклеоплазме зоны сосудистого перехода узлов кущения закалённых растений (Houde et al., 1995), обеспечивая защитную роль при транскрипции (Sarhan et al., 1997) и поддерживая транспорт метаболитов (Crespi et al., 1991).

4. *Растительные митохондриальные разобщающие белки (PUMP).* PUMP (англ. “Plant Uncoupling Mitochondrial Protein”) обнаружены в митохондриях однодольных и двудольных растений (Jezek et al., 1997, 1998, 2000). Они имеют высокую гомологию с разобщающими белками животных UCP1 и UCP2 (Bouillaud et al., 2001; Vercesi, 2001). Экспрессия генов разобщающих белков и повышение их активности происходит при гипотермии (Попов и др., 2011; Calegario et al., 2003). PUMP принадлежат к семейству митохондриальных переносчиков анионов, с помощью которых осуществляется разобщение процессов окисления и фосфорилирования, что приводит к выделению тепла (Nogueira et al., 2005). Их функционирование связано с циклическим оборотом ЖК (Скулачев, 1989; Jezek et al., 1997; Skulachev, 1999). Таким образом, PUMP принимают участие в низкотемпературной адаптации растений при помощи термогенеза, а также их действие направлено на снижение образования активных форм кислорода (АФК) в клетке (Smith et al., 2004). Выделение тепла растениями при небольших морозах способствует более медленному выходу воды из клеток в межклетники (Трунова, 2007). Белок холодового шока с молекулярной массой 310 кДа разобщает окисление и

фосфорилирование в митохондриях и вызывает снижение температуры начала нуклеации льда в растениях (Войников, 1987; Колесниченко и Войников, 2003).

5. *Нуклеаторы льда.* Нуклеаторы представляют собой надмолекулярные комплексы, которые помимо белков включают в себя сахара и липиды. Без нуклеаторов невозможна инициация льдообразования в межклетниках. Работая совместно с антинуклеаторами (антифризами), нуклеаторы регулируют начало и локализацию льдообразования (Титов и Таланова, 2009). Выявлен бактериальный ген-*inaz*, продукт которого – белок INAZ, накапливается в трансгенных растениях при закаливании и ускоряет нуклеацию льда при отрицательных температурах (Van Zee et al., 1996).

1.2.4. Накопление сахаров

На протяжении многих десятилетий исследователи отмечали увеличение содержания водорастворимых углеводов в растениях под действием низких температур. В настоящее время не вызывает сомнения, что между устойчивостью растений к гипотермии и содержанием сахаров наблюдается положительная корреляция (Лэмб, 1970; Туманов, 1979; Касперска-Палач, 1983; Ли и Палта, 1983; Колупаев и Трунова, 1992; Медведев, 2004; Косулина и др., 2011; Боровик и др., 2013, 2014; Колупаев и др., 2015; Kerepesi et al., 2004; Zeng et al., 2011).

Одним из механизмов избегания образования внутриклеточного льда в процессе температурной адаптации является увеличение проницаемости клеток для воды, что приводит к выходу воды в межклетники и внеклеточному льдообразованию (Левитт, 1983), но при этом клетки обезвоживаются. Данный путь оптимален для многолетних растений (деревьев и кустарников), которые относительно легко переносят сильное обезвоживание клеток при действии низких температур. Травянистые же растения более чувствительны к обезвоживанию, при закаливании их клетки теряют значительно меньше воды (Красавцев, 1972), поэтому зиму они переносят в более обводнённом состоянии. Формирование морозостойкости зимующих злаков происходит на фоне

повышения водоудерживающей способности клеток и предотвращения внутриклеточного замерзания этой воды, что может обеспечиваться осморегуляторными и коллигативными свойствами водорастворимых углеводов. Поэтому содержание сахаров при закаливании в большей степени увеличивается именно у травянистых растений (Трунова, 2007; Кошкин, 2010).

В период околонулевых температур в клетках накапливается большое количество продуктов фотосинтеза (Лэмб, 1970), поскольку у морозостойких растений интенсивность фотосинтеза значительно превышает активность дыхания (Климов, 1998, 2001; Климов и др., 2004), что приводит к накоплению большого количества сахаров (Климов и др., 1993), выполняющих полифункциональную роль при низкотемпературной адаптации растений (Туманов, 1979; Трунова, 2007). Можно выделить следующие функции сахаров, накапливающихся при закаливании:

1. Удержание воды (*водоудерживающая роль, осморегуляторная роль*) достигается повышением осмотического потенциала клетки за счёт увеличения концентрации осморегулирующих веществ – сахаров (моно- и олигосахаридов). В клетках возрастает относительное количество коллоидно-связанной воды (Трунова, 2007; Косулина и др., 2011).

2. Предотвращение внутриклеточного замерзания воды (*антифризная роль*). Сахара способны контролировать образование льда благодаря своим коллигативным свойствам (Santarius, 1992). Водорастворимые углеводы снижают точку замерзания растворов и не включаются в состав льда (Williams, 1992). Разветвлённые молекулы полисахаридов функционируют как антинуклеаторы и могут снижать температуру нуклеации льда в растворах до -7°C (Goldstein and Nobel, 1991).

3. *Криопротекторная роль* сахаров заключается в образовании гликопротеидных комплексов, что предотвращает денатурацию белков, повышая их устойчивость. Сахара (раффиноза, трегалоза, сахароза, мальтоза, глюкоза) участвуют в стабилизации клеточных мембран органоидов (Косулина и др., 2011; Crowe et al., 1988; Iordachescu and Imai, 2008), взаимодействуя с

полярными группами фосфолипидов и образуя дополнительные гидрофобные связи (Caffrey et al., 1988).

4. *Антиоксидантная роль* низкомолекулярных сахаров, поскольку гипотермия сопровождается накоплением АФК и продуктов ПОЛ (Deryabin et al., 2004).

5. Сахара являются основными субстратами дыхания (Головко, 1999), используются для синтеза липидов и стресс-белков в процессе адаптации к холоду и при репарации (Трунова, 2007; Кузнецов и Дмитриева, 2011).

6. Возможно участие сахаров в передаче (трансдукции) низкотемпературного сигнала (Чиркова, 2002). Показано, что олигосахарин увеличивает восприимчивость клеток к АБК-сигнальным путям, что приводит к увеличению устойчивости озимой пшеницы к морозу, обезвоживанию (Zabotin et al., 2009).

У закалённых к морозу злаков около 90% водорастворимых углеводов локализуется в цитозоле, в клеточном соке вакуолей, в хлоропластах, и около 10% – в межклетниках (Трунова, 1969; Koster and Lynch, 1992). Морозостойкие растения отличаются не только способностью накапливать большее количество сахаров, но и медленнее их расходовать (Косулина и др., 2011). Увеличение содержания водорастворимых углеводов в растениях при гипотермии связано не только с процессами фотосинтеза, но и с изменением активности ферментов углеводного обмена. Так, при формировании морозостойкости отмечается уменьшение количества крахмала за счёт его гидролиза и увеличение содержания раффинозы, сахарозы, мальтозы, трегалозы, гентиобиозы, фруктозы, глюкозы (Лэмб, 1970; Туманов, 1979; Ли и Палта, 1983; Ball et al., 2002; Zeng et al., 2011). Снижение температуры ниже 0 °C приводит к расщеплению олигосахаридов, накопленных в I фазу закаливания (Трунова, 2007).

В гидролизе крахмала участвуют *амилазы* (α ,- β -амилазы). β -амилаза отделяет дисахарид мальтозу с конца молекулы крахмала (Хелдт, 2011). Выявлено, что экспрессия генов β -амилазы может индуцироваться гипотермией. Так, при холодовом воздействии (5 °C) на растения арабидопсиса наблюдалась

индукция генов β -амилазы, что приводило к увеличению содержания мальтозы, которая в условиях гипотермии способна защищать фотосинтетическую электрон-транспортную цепь (Kaplan and Guy, 2004).

Одним из основных ферментов, участвующих в повышении содержания низкомолекулярных сахаров при низкотемпературных воздействиях, является *инвертаза*, катализирующая гидролиз сахарозы с образованием глюкозы и фруктозы (Колупаев и Трунова, 1992; Roberts, 1975). Установлено, что активность инвертазы увеличивается при понижении температуры (Проценко и Колоша, 1969; Колупаев и Трунова, 1994) и при низкотемпературном закаливании (Климов и др., 2004; Попов и др., 2013). При этом происходит как изменение активности фермента (взаимный переход растворимой и связанных форм), так и синтез фермента *de novo* (Дерябин и др., 2003; Deryabin et al., 2005).

Отмечается увеличение активности *сахаросинтазы*, катализирующей обратимую реакцию образования УДФ-глюкозы и фруктозы из сахарозы и УДФ (Хелдт, 2011) при гипотермии (Calderón and Pontis, 1985), а также в ответ на увеличение содержания сахарозы и раффинозы (Zeng et al., 2011).

Показано, что увеличение содержания сахаров (в основном, сахарозы и фруктозы) может происходить у злаков после обработки экзогенной АБК (Kerepesi et al., 2004). При этом также изменяется экспрессия генов ключевых ферментов метаболизма углеводов (ферменты гликолиза, цикла Кребса и ПФП).

На накопление сахаров в тканях озимых культур при действии низкой температуры оказывает влияние продолжительность светового периода, так с увеличением его длительности при закаливании растений озимой пшеницы накопление сахаров в листьях возрастало (Боровик и др., 2013). В то же время содержание водорастворимых углеводов в тканях озимой пшеницы в оптимальных условиях и при холодовом закаливании определяло интенсивность дыхания митохондрий, а также функционирование альтернативной оксидазы и альтернативных НАД(Ф)-Н-дегидрогеназ (Боровик, 2015). Чем больше сахаров накапливалось в листьях при закаливании, тем выше была активность альтернативных ферментов дыхания (Боровик и др., 2013, 2014).

1.2.5. Изменение дыхательного метаболизма

Изменение дыхательного метаболизма при низких температурах зависит от многих факторов, в частности от скорости снижения температуры, продолжительности низкотемпературного стресса (Кислюк и др., 1995), от условий освещённости (Боровик, 2015; Steffen and Palta, 1986), степени холодоустойчивости растений, их способности к акклиматизации (Семихатова, 1995; Головки, 1999; Семихатова и Чиркова, 2001; Семихатова и др., 2009).

Гипотермия оказывает повреждающее действие на клеточные мембраны. Низкие температуры вызывают фазовый переход липидов мембран из жидкокристаллического состояния в состояние твёрдого геля (Lyons, 1973). Хотя митохондрии являются достаточно устойчивыми органоидами за счёт наличия двойной мембраны, их функционирование нарушается под действием экстремальных температур (Трунова, 2007; Грабельных и др., 2014а). Нарушения мембранной структуры вызывают утечку протонов, изменяют баланс ионов, разобщают процессы окисления и фосфорилирования в митохондриях (Грабельных и др., 2014а). Накапливаются токсические метаболиты (ацетальдегид, этанол), АФК (Чиркова, 2002; Грабельных и др., 2014а,б). Продолжительный низкотемпературный стресс (особенно замораживание) приводит к необратимым повреждениям функций митохондрий (Головки, 1999; Трунова, 2007; Грабельных и др., 2014а), а закаливание растений предотвращает эти повреждения (Грабельных и др., 2014а).

В зимний период из-за обезвоживания клеток растений внеклеточным льдом прекращаются рост и фотосинтез, а интенсивность дыхания (интенсивность поглощения кислорода и дыхательный коэффициент) снижается в несколько раз (Трунова, 2007). Тем не менее, стрессовые условия могут усиливать дыхание для целей репарации повреждений, синтеза специфических метаболитов, выполняющих защитные функции (Головки, 1999). В связи с этим небольшая стимуляция дыхания после охлаждения растений является реакцией адаптации, а сильное увеличение (Зауралов и Лукаткин, 1997) или снижение

дыхания (Климов, 1998) характеризует развитие повреждений растения (Кошкин, 2010).

Гипотермия приводит к экспрессии генов и увеличению активности ряда ферментов гликолиза. Для большинства растений ключевыми субстратами дыхания является крахмал и сахароза (Головко, 1999). В цитозоле увеличивается скорость реакций гидролиза сахарозы (активация *инвертазы* и *сахарозосинтазы*). Большое значение для холодовой адаптации имеет регуляторная точка в гликолизе на уровне *АТФ-зависимой фосфофруктокиназы* (катализирует превращение фруктозо-6-фосфата в фруктозо-1,6-бисфосфат) (Atkin et al., 2000; Shi et al., 2013), также в хлоропластах увеличивается скорость превращения 3-фосфоглицериновой кислоты в 2-фосфоглицериновую кислоту (активация *фосфоглицератмутазы*), 2-фосфоглицериновой кислоты в фосфоенолпируват (увеличение экспрессии гена *енолазы*) (Yan et al., 2006) и фосфоенолпирувата в пируват (активация *пируваткиназы*) (Atkin et al., 2000). Поступление углерода на дыхание или на синтез сахаров регулируется *пирофосфатзависимой фосфотрансферазой*, которая может работать в двух направлениях (в гликолизе и в глюконеогенезе), что важно для адаптации растений к низким температурам (Головко, 1999). При холодовой акклимации экспрессируется ген, кодирующий синтез белка, высокомолекулярного белка *АТФ-зависимой фосфоенолпируваткарбоксилазы* (Sáez-Vásquez et al., 1995), играющему ключевую роль в пути глюконеогенеза (Головко, 1999).

Образующийся в процессе гликолиза пируват поступает в митохондрии, где при наличии достаточного количества кислорода окисляется в цикле ди- и трикарбоновых кислот (цикл Кребса). В первой реакции окисления пирувата участвует *пируватдегидрогеназный комплекс* (ПДК), состоящий из трёх ферментов. В результате образуется ацетил-коэнзим А. В матриксе митохондрий растений имеется *НАД-зависимый малик-энзим*, который окисляет малат до пирувата (Семихатова и Чиркова, 2001). Таким образом, можно сказать, что ПДК и НАД-зависимый малик-энзим – основные ферменты, контролирующие поступление пирувата в митохондрии. Активность этих ферментов при низких

температурах снижается. Также при гипотермии снижается экспрессия гена, кодирующего *аконитатгидратазу* (фермент цикла Кребса) (Yan et al., 2006).

Процесс окислительного фосфорилирования также реагирует на снижение температуры. Имеется положительная корреляция между зимостойкостью злаков и температурой, подавляющей фосфорилирование и окисление (Семихатова и Чиркова, 2001). У морозоустойчивых растений активность *АТФ-синтазы* снижается медленнее. Дыхание митохондрий сначала возрастает, что связано с повышенным расходом энергии на адаптационные процессы. Снижение содержания АТФ и отношения АТФ/АДФ в начальный момент закаливания незначительно (Shi et al., 2013). Благодаря этому в первую фазу закаливания растения накапливают необходимые для перенесения зимнего сезона метаболиты, среди которых значительную часть составляют сахара. Однако если интенсивность дыхания во время зимнего периода не будет снижаться, растения озимых зерновых культур могут погибнуть из-за расхода сахаров на дыхание. Предполагают, что лучше перезимовывают растения с более низкой интенсивностью дыхания (Лэмб, 1970). Действительно, скорость дыхания узлов кущения озимых злаков значительно снижается в зимний период, однако у менее устойчивой к морозу озимой пшеницы поздней зимой и ранней весной быстрее происходит активация дыхания, что в итоге приводит к более быстрому расходованию сахаров и гибели части растений (Поморцев, 2013; Поморцев и др., 2013).

Часто повышенное дыхание во время закаливания к холоду объясняют активацией в митохондриях альтернативного пути транспорта электронов, связанного с функционированием альтернативной оксидазы. Большинство растений при воздействии пониженной температурой обладают повышенной интенсивностью дыхания (Семихатова, 1990, 1995; Семихатова и др., 2009). У арктических растений активируется альтернативный путь транспорта электронов, что свидетельствует о его значимости в условиях гипотермии (Kornfeld et al., 2013). *Альтернативная (антимитохондриальная А- и цианид-резистентная) UQH₂-оксидаза (АО)*, или *убихинол-оксидаза* (Шугаев, 1991; Меденцев и др.,

1999) расположена во внутренней мембране митохондрий и переносит электроны с убихинона на кислород, катализируя четырёхэлектронное восстановление кислорода до воды (Siedow and Umbach, 2000) укороченным путём без сопряжения с протонным транспортом, что приводит к высвобождению энергии в виде тепла. Альтернативная оксидаза не чувствительна к антимицину А и KCN, но ингибируется гидроксамовыми кислотами, в частности бензгидроксамовой или салицилгидроксамовой (Семихатова и Чиркова, 2001). Показано, что под действием низких положительных температур повышается содержание белка АО (González-Meler et al., 1999), уровень транскриптов АО и возможность к транспорту электронов по альтернативному пути (Mizuno et al., 2008). На увеличение способности альтернативной оксидазы к транспорту электронов, а в некоторых случаях и на увеличение доли альтернативного пути в дыхании при низких температурах указывают многочисленные работы (Atkin et al., 2002; Calegario et al., 2003; Fiorani et al., 2005; Sugie et al., 2006; Covey-Crump et al., 2007; Matos et al., 2007; Armstrong et al., 2008; Mizuno et al., 2008; Macfarlane et al., 2009; Van Aken et al., 2009). В работах Calegario с соавт. (2003), Matos с соавт. (2007) и Mizuno с соавт. (2008) выявлена важная роль АО при адаптации растений к холоду. Одной из функций АО в этом случае является её антиоксидантная роль (Грабельных и др., 2011; Sugie et al., 2006). Однако активация АО может приводить к расходованию сахаров (Wang et al., 2011), что отрицательно сказывается на холодо- и морозоустойчивости растений. В то же время активация альтернативного пути дыхания в весенний период рассматривается как адаптивная реакция, направленная на обеспечение необходимых биосинтезов (Иванова и др., 1998).

В регуляции степени сопряжения процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях при гипотермии помимо АО участвуют *разобшающие белки* (Borecký and Vercesi, 2005) и *свободные жирные кислоты* (СЖК) (Войников, 2013). При понижении температуры активируется фосфолипаза А₂, которая приводит к накоплению СЖК. Митохондриальный разобшающий белок вместе с АТФ/АДФ-антипортером включается в транспорт

анионов жирных кислот через митохондриальную мембрану. В результате конкурентного блокирования АТФ/АДФ-антипортера жирными кислотами транспорт АДФ и АТФ через внутреннюю мембрану митохондрий ингибируется, повышается активность альтернативного пути транспорта электронов, что приводит к рассеиванию энергии в виде тепла (Чиркова, 2002). Альтернативный путь в этот период выполняет защитную функцию, способствующую ускорению окисления и термогенезу, защищая растения от переохлаждения и образования внутриклеточного льда (Чиркова, 2002).

Некоторые разобщающие белки (StUCP и PUMP в клубнях картофеля, AtPUMP (AtUCP1) у арабидопсиса, SfUCPa и SfUCPb в початках *S. foetidus*) индуцируются холодом (Maia et al., 1998; Ito, 1999; Calegario et al., 2003), поэтому можно предполагать, что они принимают участие в защите растений от низкотемпературного стресса. Это подтверждается данными о том, что в промоторной области *AtUCP1* и *AtUCP2* идентифицирован регуляторный элемент ABRE (англ. “Absciscic Acid Responsive Element”) (Nogueira et al., 2011), который присутствует в промоторных последовательностях генов, связанных с ответом на холодовой стресс. Присутствие ABRE согласуется с индукцией синтеза UCP1 у арабидопсиса и с увеличением его активности при низких температурах (Maia et al., 1998; Hourton-Cabassa et al., 2004; Figueira and Arruda, 2011). Разобщающие белки принимают участие в термогенезе растений, в предотвращении окислительного стресса, в поддержании работы цикла Кребса и фотосинтетического метаболизма (Kowaltowski et al., 1998; Jezek et al., 2001; Brandalise et al., 2003; Smith et al., 2004; Sweetlove et al., 2006; Onda et al., 2008) и др.

На культуре клеток томата установили, что экспрессия генов АО, разобщающего белка и АТФ/АДФ-антипортера контролируется уровнем АФК, что может являться механизмом индукции процессов «свободного» окисления при холодной адаптации растений (Попов и др., 2011).

При холодной адаптации происходит изменение активности ключевых ферментов дыхания. Активность *дегидрогеназ* возрастает в первую фазу

закаливания и убывает во вторую, что связано с усилением их роли в поставке НАДФ·Н, необходимых для усиливающихся в первую фазу синтетических процессов, обмена и накопления защитных веществ (сахаров, аминокислот, белков) (Чиркова, 2002). *Ротенон-нечувствительные НАД(Ф)·Н-дегидрогеназы* растительных митохондрий участвуют в передаче электронов на убихинон, окисляя цитоплазматический и матриксный НАД(Ф)·Н (Møller, 2001; Finnegan et al., 2004; Rasmusson et al., 2008), и которые, возможно, участвуют в ответной реакции растений на низкую температуру. Показано, что окисление экзогенного НАД(Ф)·Н изолированными растительными митохондриями ингибируется хелаторами ди- и тривалентных катионов (ЭДТА и ЭГТА) (Møller, 2001), поэтому окисление цитозольного НАД(Ф)·Н может активироваться при увеличении концентрации Ca^{2+} , происходящего при охлаждении растений (Knight et al., 1996). Показано, что экзогенная АБК приводит к индукции экспрессии генов внутренних альтернативных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ NDA1-2 (Elhafez et al., 2006). Окисление цитоплазматического НАД(Ф)·Н у растений может осуществляться тремя дегидрогеназами, две из которых являются Ca^{2+} -зависимыми: NDB1 (НАДФ·Н-дегидрогеназа) и NDB2 (НАД·Н-дегидрогеназа) (Rasmusson et al., 2008). С использованием изолированных митохондрий из корнеплодов столовой и сахарной свёклы, озимой пшеницы выявлены различия в активности дегидрогеназ, участвующих в окислении экзогенного НАД·Н и НАДФ·Н, при этом окисление экзогенного НАД·Н при закаливающих к холоду температурах протекает с большей скоростью (Грабельных и др., 2014б; Fredlund et al., 1991; Zottini et al., 1993). Высокая скорость окисления экзогенного НАД·Н и сохранение степени сопряжения окисления с фосфорилированием были характерны для митохондрий из гороха, инкубируемых при температуре $-3,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Stupnikova et al., 2006), что позволяет предположить важную роль окисления внешнего НАД·Н митохондриями при адаптации к холоду. На это также указывают данные, полученные на *A. thaliana*, в которых показана экспрессия гена NDB2 после действия низких температур и экзогенной АБК (Elhafez et al., 2006).

Фазовые изменения митохондриальных мембран определяют активность митохондрий (Хохлова и др., 1990; Lyons and Raison, 1970). Холодовое закаливание этиолированных проростков озимой пшеницы приводило к увеличению ненасыщенности жирных кислот мембран митохондрий (Грабельных и др., 2014a; Pomeroy and Andrews, 1975; Pomeroy, 1977). Повышение ненасыщенности ЖК липидов митохондриальных мембран в процессе закаливания, возможно, было причиной сохранения энергетической эффективности дыхания в митохондриях холодоустойчивых сортов озимой пшеницы и позволяло обеспечивать синтетические процессы в клетке при закаливании (Нарийчук и Бабенко, 1981; Хохлова и др., 1993; Грабельных и др., 2014a).

1.3. ПРОЦЕССЫ, ПРОТЕКАЮЩИЕ В ПЕРИОД РАЗЗАКАЛИВАНИЯ ТРАВЯНИСТЫХ РАСТЕНИЙ

Раззакаливание (*деакклимация*), происходящее в естественных условиях, имеет сезонный характер и обычно начинается весной, при этом растения утрачивают свойства, приобретённые во время закаливания в осенний период (Чиркова, 2002). Такую естественную деакклимацию называют «активной» (Kalberer et al., 2006).

В регионах с нестабильным зимне-весенним температурным режимом внезапное повышение температуры в результате оттепелей зимой может вызвать раззакаливание зимующих растений в нехарактерный для этого период времени. При этом морозостойкость растений снижается всего за несколько дней (Chen and Li, 1980). Поэтому даже небольшие заморозки в это время могут вызвать гибель растений (Кошкин, 2010; Eagles and Williams, 1992; Kalberer et al., 2006).

Между морозостойкостью растений и ростовыми процессами существует тесная связь. Переход к состоянию покоя сопровождается повышением устойчивости, которую растения приобретают в процессе длительной низкотемпературной адаптации. При наступлении оптимальных для роста условий растения переходят к вегетации, а их устойчивость снижается (Кошкин,

2010). Раззакаливание становится необратимым, когда растения трогаются в рост (Rapacz, 2002; Kalberer et al., 2006). Если в этот период температура понизится очень быстро (заморозки), растения могут погибнуть. Если же температура будет опускаться постепенно (при условии, что растения ещё не перешли к активной вегетации), возможен запуск второй фазы закаливания, что приведёт к повторному повышению уровня морозостойкости растений – *реакклимации* (Чиркова, 2002; Rapacz, 2002; Kalberer et al., 2006).

Таким образом, перенесение зимнего периода определяется зимостойкостью растений в целом (возможность адаптироваться к повторяющимся оттепелям, устойчивость к выпреванию и образованию ледяной корки), а не только способностью выживать в условиях действия очень низких температур (Чиркова, 2002; Дорофеев и др., 2004; Кузнецов и Дмитриева, 2011).

1.3.1. Зависимость скорости раззакаливания от температуры и длительности её воздействия

Выявлено, что скорость наступления раззакаливания зависит от качества и глубины холодого закаливания (Титов и др., 2006). Однако раззакаливание протекает всегда быстрее, чем закаливание (Svenning et al., 1997; Jørgensen et al., 2010). Например, растения огурца, закалённые при 12 °С, раззакаливались через 2-3 суток при температуре 25 °С, тогда как закалённые при 9 °С (имеющие более высокую устойчивость) раззакаливались через 6 дней (Титов и др., 2006). Полное раззакаливание кукурузы, закалённой при 10 °С, происходило через 2-3 дня, а томата, закалённого при 8 °С, – через 4 дня при температуре 22 °С (Титов и др., 2006). Пшеница, закалённая при 4 °С, и ячмень, закалённый при 2 °С, раззакаливались через 7-8 дней при температуре 22 °С и 25 °С, соответственно (Титов и др., 2006).

Скорость деакклимации определяется температурой окружающей среды: чем выше температура, тем быстрее скорость раззакаливания (Svenning et al., 1997). Так, листья картофеля раззакаливались при 20 °С быстрее, чем при 10 °С (Chen and Li, 1980), а узлы кущения озимой пшеницы и озимой ржи – при 20 °С,

чем при 15 °C или 10 °C (Gusta and Fowler, 1976). Полное раззакаливание характеризуется снижением устойчивости до исходного уровня, которое растение имело до закаливания. Если повышение температуры происходит в пределах температур холодого закаливания, возникает неполная потеря устойчивости (частичное раззакаливание) (Титов и др., 2006).

При моделировании условий раззакаливания (помещение закалённых растений в оптимальные для вегетации температурные условия) приобретённая устойчивость растений, прежде чем начать снижаться, в течение определённого времени (лаг-период) сохраняется на максимальном уровне (Титов и др., 2006; Kalberer et al., 2006). Так, статистически значимое снижение устойчивости проростков пшеницы, закалённых при 2 °C, происходило в среднем через 6 часов, а растений томата, закалённых при 8 °C, – через 2-3 часа (Титов и др., 2006). Раззакаливание листьев картофеля, закалённого при 2 °C в течение 15 дней, начиналось через 2-3 часа, а полное раззакаливание происходило через 1 день при температуре 20 °C (Chen and Li, 1980).

1.3.2. Физиолого-биохимические изменения при раззакаливании

Физиолого-биохимические изменения клеточного метаболизма при раззакаливании растений, в основном, противоположны изменениям, происходящим при закаливании. Известные из литературы по этому вопросу данные немногочисленны и касаются таких параметров, как изменение оводнённости тканей, содержания водорастворимых углеводов, липидного состава мембран и синтеза стрессовых белков.

1. *Оводнённость тканей.* Раззакаливание и возобновление роста связаны с тканевой и клеточной регидратацией. Быстрое снижение температуры окружающей среды при высокой оводнённости клетки приводит к внутриклеточному льдообразованию (Ashworth, 1992). Наблюдается зависимость между увеличением содержания воды, повышением скорости роста растений и снижением их холодоустойчивости (Rapacz, 2002; Webster and Ebdon, 2005). В узлах кущения злаков содержание воды увеличивалось при

деакклимации и сопровождалось понижением холодоустойчивости злаков (Gusta and Fowler, 1976; Webster and Ebdon, 2005).

2. *Содержание водорастворимых углеводов.* Метаболизм водорастворимых углеводов изменяется при деакклимации. Водорастворимые углеводы, накопившиеся в период фазы закаливания, начинают расходоваться весной при повышении температуры и отрастании растений. На это указывают многочисленные работы (Рыбакова, 1989; Поморцев, 2013; Eagles and Williams, 1992; Tronsmo et al., 1993; Sasaki et al., 1996; Svenning et al., 1997; Ögren, 1997), в которых прослежена связь между снижением уровня сахаров и степени холодоустойчивости при раззакаливании. Так, содержание сахаров при деакклимации может уменьшаться до 54% от содержания сахаров в закалённом состоянии (Ögren, 1997). При этом происходит снижение уровня глюкозы, фруктозы и сахарозы (Рыбакова, 1989; Tronsmo et al., 1993; Sasaki et al., 1996; Svenning et al., 1997), а также пролина (Svenning et al., 1997).

Содержание сахаров в узлах кущения озимой пшеницы в весенний период после схода снега и до возобновления вегетации было намного ниже после тёплой зимы по сравнению с холодной. Содержание водорастворимых углеводов не только выявляет сортовые различия озимой пшеницы, но и служит показателем для диагностики состояния озимых посевов, что особенно информативно в годы с тёплыми зимами (Рыбакова, 1989).

С использованием сортов белого клевера, различающихся по степени морозоустойчивости, было показано, что содержание общих водорастворимых углеводов, пролина и других свободных аминокислот при раззакаливании выше у более морозоустойчивых сортов. При этом наблюдалась положительная корреляция между содержанием сахарозы и LT_{50} (температурой, вызывающей гибель 50% растений) при раззакаливании как у устойчивых, так и у неустойчивых сортов (Svenning et al., 1997).

В узлах кущения озимой пшеницы, ржи и тритикале наблюдали различия в содержании общих водорастворимых углеводов и пролина в зимний и весенний периоды. Так, содержание сахаров в узлах кущения закалённых

растений было выше у ржи. Расход сахаров в зимний и весенний периоды происходил медленнее у озимой ржи и тритикале, а у менее морозоустойчивой озимой пшеницы – быстрее. Содержание пролина в зимний и весенний периоды было ниже у озимой пшеницы, а у озимой ржи наблюдали самое высокое содержание пролина, второй пик которого приходился на период реакклимации (Поморцев, 2013). Наблюдалась связь между расходом сахаров, интенсивностью дыхания и морозоустойчивостью в весенний период. Большой расход сахаров у озимой пшеницы был связан с более высокой скоростью дыхания, что снижало устойчивость растений к отрицательным температурам (Поморцев, 2013; Поморцев и др., 2013).

Во время деакклимации изменяется содержание и активность ферментов, вовлечённых в метаболизм углеводов. Так, на растениях арабидопсиса было показано, что при раззакаливании происходит экспрессия гена предполагаемой *мио*-инозитол-оксигеназы, которая продуцирует D-глюкуронат (Yoshioka et al., 2004). Также происходит снижение инвертазной активности у тимOFFеевки луговой при раззакаливании (Tronsmo et al., 1993), увеличение α -галактозидазной активности (Tronsmo et al., 1993; Pennycooke et al., 2004), приводящей к расщеплению олигосахаридов (раффиноза, стахиоза, меллобиоза), которые аккумулируются при закаливании. Увеличение активности α -галактозидазы связано с повышением экспрессии гена, кодирующего этот фермент, которая происходит в начальный период деакклимации (Pennycooke et al., 2004).

3. *Липиды и мембраны.* Изменение липидного состава клеточных мембран при раззакаливании плохо изучено. Немногочисленные работы указывают на то, что, происходящие в составе липидных мембран в этот период изменения, являются противоположными изменениям осеннего закаливания (Климов и др., 1993; Yoshida, 1986; Iivonen et al., 2004).

Деакклимация сопровождается снижением соотношения показателей фосфолипид/белок, фосфолипид/стерины, ненасыщенные/насыщенные фосфолипиды (Yoshida, 1986; Iivonen et al., 2004). Эти изменения снижают

способность клеточных мембран выдерживать отрицательные температуры (Kalberer et al., 2006).

4. *Белки.* Особую значимость в механизмах закаливания и раззакаливания играет экспрессия генов дегидринов семейства белков LEA II (Kalberer et al., 2006). Состояние максимальной морозоустойчивости сопровождается максимальным содержанием дегидринов, что показано как на древесных, так и травянистых растениях. Накопление дегидринов происходит при закаливании растений в осенний период и снижается во время деакклимации весной. Низкомолекулярные дегидрины в большей степени отвечают за морозоустойчивость, поскольку наблюдается снижение их количества в период раззакаливания (Бубякина и др., 2011; Петров и др., 2011; Поморцев, 2013; Пономарев и др., 2014).

Деакклимация сопровождается снижением устойчивости растений к окислительному стрессу, связанному с избыточным освещением и отсутствием фотосинтеза в период покоя. На фоне сниженного содержания антиоксидантных ферментов и низкомолекулярных антиоксидантов образующиеся АФК могут приводить к повреждению макромолекул клеток (Kalberer et al., 2006).

1.4. РОСТИНГИБИРУЮЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ КАК МОДУЛЯТОРЫ ХОЛОДО- И МОРОЗОУСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ

В районах с неустойчивым весенним периодом (весенние оттепели и сменяющие их заморозки) наиболее устойчивы и урожайны сорта озимых и плодовых многолетних культур, обладающие более глубоким, длительным зимним покоем и поздним сроком возобновления весенней вегетации (Кошкин, 2010). При формировании холодовой адаптации зимующие растения переходят в состояние покоя, во многом обусловленное изменением баланса фитогормонов: уменьшением содержания ростстимулирующих (ауксины, цитокинины и гиббереллины) и увеличением ростингибирующих гормонов (АБК, этилен, жасмоновая кислота) (Касперска-Палач, 1983; Лукаткин, 2002; Чиркова, 2002; Трунова, 2007; Титов и Таланова, 2009; Кошкин, 2010).

Поскольку остановка ростовых процессов связана с повышением холодо- и морозоустойчивости растений, использование синтетических аналогов фитогормонов и других регуляторов роста является одним из перспективных способов повышения устойчивости растений (Титов и Таланова, 2009; Кошкин, 2010).

1.4.1. Применение ретардантов в сельском хозяйстве

Ретарданты – разнородная по химическому строению группа синтетических соединений, тормозящих рост органов растений, главным образом стеблей (Туркова и Калинина, 1970; Полевой, 1989).

Ретарданты получают синтетическим путём, в клетках и тканях растений на данный момент ретарданты не обнаружены. К ретардантам относятся: хлорхолинхлорид (ССС, или ХХХ, или препараты «ТУР», «ЦеЦеЦе 750/460», «Стабилан», «Антивылегал», «Центрино»); трийодбензойная кислота (ТІВА); Алар (В-9, или В-995); Фосфон-Д; АМО-1618; «Терпал» (комплексный препарат мепикватхлорида и этефона); «Моддус» (тринексапак-этил); хлормекватхлорид (содержит ретарданты СССР и «Атлет»); 2-хлорэтилфосфоновая кислота (препараты «Кампозан», «Серон», «Этефон»); «Сетар» (комплексный препарат дифеноконазола и паклобутразола); «Карамба-турбо» (комплексный препарат мепикватхлорида и метконазола) и др. (Туркова и Калинина, 1970; Касперска-Палач, 1983; Полевой, 1989; Шаповал и др., 2009, 2010; Привалов, 2012; Курьята и Ходаницкая, 2013; Рейтер, 2013).

Считают, что механизм действия ретардантов связан с подавлением синтеза гиббереллинов и ауксинов, а не с разрушением ранее образовавшихся гормонов (Рубин, 1971; Полевой, 1989). Например, к антиауксиновым ретардантам (ингибируют синтез или транспорт ауксинов) относят: трийодбензойную кислоту, нафталам, морфактин и др. (Досон и др., 1991; Кузнецов и Дмитриева, 2011). Алар ингибирует синтез 3-индолилуксусной кислоты (Досон и др., 1991). К антигиббереллиновым регуляторам роста

(ингибируют синтез гиббереллинов) относят: ССС, АМО-1618, Фосфон-Д и др. (Досон и др., 1991; Кузнецов и Дмитриева, 2011).

Наибольший эффект ретарданты оказывают на растения с удлинёнными стеблями, отличающиеся медленным ростом. У злаков ретарданты замедляют вытягивание междоузлий посредством торможения деления клеток в субапикальной меристеме, ответственной за развитие стебля, что приводит к подавлению его роста. Помимо этого ретарданты стимулируют деление клеток интеркалярной меристемы междоузлий в поперечном направлении, что приводит к увеличению диаметра и прочности стебля-соломины. В связи с этим ретарданты широко используются в сельском хозяйстве для предотвращения полегания всходов (Рубин, 1971; Полевой, 1989; Шаповал и др., 2010; Рейтер, 2013). Кроме этого ретарданты используют для торможения вытягивания рассады овощей, декоративных культур, роста кустарников (Полевой, 1989). Ростингибирующее действие ретардантов не сказывается на уменьшении урожайности растений, а, наоборот, приводит к её повышению (Османьян, 2003; Бровкин и Соколенко, 2010; Привалов, 2012). Ретарданты положительно влияют на формирование фотосинтетического аппарата, увеличивают содержание хлорофилла (Курьята и Ходаницкая, 2013).

Имеются данные о стимуляции клубнеобразования у растений картофеля при совместном использовании ретардантов и фитогормонов (Дерябин и Юрьева, 2010).

Ретарданты влияют на биосинтез терпеноидов. Предуборочная обработка эфиромасличных культур ретардантами даёт возможность регулировать содержание ценных компонентов эфирного масла (Дмитриева и Дмитриев, 2011). Увеличивается количество и качество масел (Курьята и Ходаницкая, 2013).

Ретарданты усиливают ингибирующее рост действие гербицидов (Рубин, 1971). Считается целесообразным совместное применение ретардантов с другими средствами химизации: пестицидами (гербициды, фунгициды,

инсектициды) и минеральными удобрениями (Прищепа, 2000; Климова, 2002; Бровкин и Соколенко, 2010; Юшкевич и др., 2013).

Ретарданты – производные 1,2,4-триазола также обладают фунгицидным эффектом, поэтому их активно используют в качестве фунгицидов (Попов и др., 2003). Производные триазола не только подавляют биосинтез гиббереллина, оказывая, таким образом, ингибирующее влияние на рост осевых органов растений, но и увеличивают содержание эндогенной АБК (Павлова и др., 1995; Прусакова и Чижова, 1998; Павлова, 2003; Чижова и др., 2005). Биосинтез гиббереллинов и АБК осуществляется из общего предшественника – мевалоновой кислоты (изопреноидный путь). Гиббереллины образуются из ацетата и мевалоната через энт-каурен. Синтез ГК₁₂ (общего предшественника других гиббереллинов) из энт-каурена катализируется ферментами группы цитохром Р450-монооксигеназ. Активность ферментов данной группы ингибируется производными 1,2,4-триазола, что приводит к подавлению синтеза ГБ, а мевалоновая кислота начинает расходоваться на синтез других фитогормонов, в частности на синтез АБК (Vettakkorumakankav et al., 1999).

С ростингибирующим свойством ретардантов, опосредованным их влиянием на изменение содержания фитогормонов, связывают способность ретардантов повышать холодо-и морозоустойчивость растений. Кроме того, ретарданты способствуют перераспределению воды в клетке (уменьшают содержание свободной воды и увеличивают долю связанной), благодаря чему в межклетниках образуется меньше льда и снижается степень повреждения клеток (Косулина и др., 2011). Ретарданты Алар, Фосфон-Д и АМО-1618 повышали морозостойкость озимого рапса (Касперска-Палач, 1983), ССС увеличивал устойчивость озимой пшеницы, капусты, перца, томатов, плодовых и субтропических культур; трийодбензойная кислота – люцерны и сои (Кошкин, 2010; Косулина и др., 2011); препарат «Моддус» – зимостойкость озимой пшеницы (Роньжина и Рейтер, 2015). Паклобутразол (производное 1,2,4-триазола) повышал морозоустойчивость растений (Мельников и др., 1995; Прусакова и Чижова, 1998; Davis et al., 1988). Возможно, что и другие

производные триазола, регулируя содержания фитогормонов в растениях, способны влиять на холодо- и морозоустойчивость.

1.4.2. Фунгициды триазольной природы как возможные регуляторы холодо- и морозоустойчивости злаков

Производные триазола, обладающие ретардантным и фунгицидным свойствами (Мельников и др., 1995), относят к группе системных фунгицидов – *ингибиторам синтеза стеренов*, занимающим в настоящее время лидирующую позицию в области синтетических фунгицидов, активно используемых в сельском хозяйстве против болезней растений, вызываемых базидиомицетами (ржавчинные и головнёвые грибы), аскомицетами (парша, мучнистая роса, склеротиния, септориоз) и некоторыми дейтеромицетами.

Группу условно делят на две подгруппы: *ингибиторы C¹⁴-деметилирования* и *ингибиторы нескольких реакций процесса синтеза стеренов*. Наибольшее развитие и применение получили азолы, содержащие триазольную группу и относящиеся к ингибиторам C¹⁴-деметилирования (Попов и др., 2003).

Триазолы – органические соединения класса гетероциклов, имеющие пятичленный цикл с тремя атомами азота и двумя атомами углерода. В зависимости от положения атомов азота в цикле выделяют два изомера триазола: 1,2,3-триазол (вицинальный триазол, озотриазол) и 1,2,4-триазол (симметричный триазол, пирродиазол). Фунгицидным эффектом обладают 1,2,4-триазол и его производные (Попов и др., 2003).

Триазолы – наибольшая группа системных фунгицидов, только в России зарегистрировано 13 действующих веществ (д.в.) данного класса: бромуконазол, диниконазол-М, дифеноконазол, пенконазол, пропиконазол, тебуконазол, тетраконазол, триадименол, триадимефон, тритиконазол, флутриафол, ципроконазол, эпоксиконазол (Попов и др., 2003).

Триазолы малотоксичны для пчёл, почвенных организмов, птиц и других животных, имеют слабую фитотоксичность (Мельников и др., 1995; Прусакова и Чижова, 1998; Попов и др., 2003). Большинство соединений этой подгруппы

относят к 4 классу опасности (малоопасны) по оральной, накожной токсичности и 3 классу (умеренно опасны) по ингаляционной токсичности (Попов и др., 2003). Триазолы обладают низкой способностью к биоаккумуляции. Являются термически и гидролитически стабильными веществами незначительно растворимыми в воде, вследствие чего долго сохраняются в воде (4 класс опасности) и почве (период полураспада (DT_{50}) более 3 месяцев – 2 класс опасности) (Попов и др., 2003). Тем не менее, считаются экологически безопасными благодаря высокой биологической активности, эффективности в малых дозах и, следовательно, низким нормам расхода (30-250 г д.в./га) (Мельников и др., 1995; Попов и др., 2003).

Триазолы являются системными фунгицидами защитного и лечебного действия, используются как для обработки семян, так и надземных органов растений. Вследствие химической стабильности оказывают длительное защитное действие, а растворимость в воде обеспечивает их передвижение из корней в надземную часть растений (передвигаются по апопласту; в основном преобладает восходящий транспорт; передвижение из обработанных листьев к корням и даже стеблям для большинства представителей класса ограничено) (Прусакова и Чижова, 1998; Попов и др., 2003; Wang et al., 1986).

Фунгицидное действие 1,2,4-триазола и его производных определяется торможением четвёртой стадии биосинтеза эргостерола в клетках грибов (Попов и др., 2003; Davis et al., 1988). Триазолы, связываясь с железом гема и апопротеиновой частью фермента цитохром P450-зависимой 14- α -деметилазы (P450_{14Dm}), ингибируют её активность, препятствуя, таким образом, прохождению реакции отщепления метильной группы в 14-м положении от ланостерола и превращения его в эргостерол (Навашин, 1998). Инактивация P450_{14Dm}, ведущая к подавлению биосинтеза эргостерола, также обуславливает накопление в клетке ланостерола и ряда 14-метилованных стеролов. Дефицит эргостерола, включение предшественников эргостерола и продуктов их ферментативных превращений в клеточную мембрану грибов вызывают значительные нарушения структуры, устойчивости, плотности, проницаемости

и функций мембраны, влияют на активность связанных с ней ферментов. Помимо этого в грибных клетках прекращается синтез ННЖК, которые частично заменяются пальмитиновой кислотой (Навашин, 1998).

Триазолы способны ингибировать синтез стероидов, терпеноидов и у растений, вследствие чего уменьшается транспирация растений (Попов и др., 2003; Davis et al., 1988; Naughan et al., 1988; Benton and Cobb, 1997).

1,2,4-триазолы обладают мембранотропной активностью, которая определяется наличием липофильного заместителя в положении N-1 триазольного кольца, взаимодействующего с липидными компонентами мембран. В зависимости от структуры данного заместителя изменяется активность ион-транспортных систем плазмалеммы (K^+ -каналов, H^+ -АТФазы). N-1 заместители триазольного кольца пропиконазола, тебуконазола, ципроконазола обуславливают пассивную проницаемость плазмалеммы к ионам натрия и калия (Дитченко и др., 2002; Юрин и Дитченко, 2009).

Ретардантное действие триазола и его производных обусловлено подавлением биосинтеза гиббереллина (гибберелловой кислоты – ГК₃) в трёх его звеньях уже на ранних стадиях развития растений (Прусакова, 1989; Naughan et al., 1988; Kende and Zeevaart, 1997). Кроме этого некоторые производные триазола способны подавлять действие экзогенного гиббереллина (Hradilík and Fišerová, 1986; Lucangeli and Bottini, 1997).

Производные триазола оказывают ретардантное действие на осевые органы (укорачивают длину и увеличивают диаметр побегов, стеблей) плодовых, зерновых (предотвращают полегание), овощных, бобовых, крупяных и декоративных культур; оказывают ростостимулирующее действие на корневую систему многих растений; усиливают образование плодовых почек, ускоряют цветение, улучшают качество плодов (Прусакова и Чиждова, 1990; Павлова и др., 1995; Прусакова и Чиждова, 1998; Davis et al., 1988); вызывают торможение роста проростков (Прусакова и Чиждова, 1998; Davis et al., 1988; Steinbach et al., 1997); увеличивают энергию прорастания и всхожести семян яровой пшеницы, улучшают показатели продуктивности яровой пшеницы (Гришечкина и др.,

2015). Производные триазола увеличивают содержание хлорофилла (Прусакова и Чинова, 1998); оказывают влияние на метаболизм углеводов, подавляя активность α -амилазы, фруктанэкзогидролазы, способствуют накоплению крахмала (Чинова, 1989; Yim et al., 1997).

Показано, что фунгициды являются сильными, но неспецифическими ингибиторами дыхания, так, системный фунгицид байлетон (производное 1,2,4-триазола) подавлял дыхательный газообмен корней пшеницы, оказывая влияние на комплекс I дыхательной цепи митохондрий (Сафина-Осташевская и Гордон, 1984).

Имеются сведения, что некоторые триазолы (например паклобутразол, униконазол, тетраконазол, пропиконазол) повышают устойчивость растений к температурным стрессам (низким/высоким температурам), водному дефициту и засухе (снижают транспирацию и увеличивают водоудерживающую активность листьев), хлоридному засолению, окислительному стрессу (активируют антиоксидантные ферментативные и неферментативные системы, снижают ПОЛ) (Прусакова и Чинова, 1998). Так, при тепловом стрессе у проростков пшеницы, обработанных паклобутразолом, увеличивалась активность целого ряда антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы, каталазы, аскорбатпероксидазы, глутатионредуктазы и гваяколпероксидазы (Kraus and Fletcher, 1994). При сравнении эффектов от обработок проростков пшеницы паклобутразолом, тетраконазолом и пропиконазолом было выявлено, что наибольшее повышение устойчивости растений к температурным стрессам, водному дефициту и засухе происходит при их обработке паклобутразолом (Gilley and Fletcher, 1997).

Показано, что производные триазола увеличивают содержание эндогенной АБК (Павлова и др., 1995; Прусакова и Чинова, 1998; Павлова, 2003; Чинова и др., 2005) – основного полифункционального стрессового гормона растений, повышающего уровень неспецифической устойчивости растений к вышеперечисленным стрессам и выступающего в качестве ингибитора роста (Меняйло, 1992; Кефели, 1997; Титов и Таланова, 2009; Косулина и др., 2011;

Moons et al., 1995; Thomashow, 1999; Kerepesi et al., 2004; Verslues and Bray, 2006; Wang and Zhang, 2008; Parent et al., 2009). Поэтому можно предположить, что производные триазола участвуют в повышении устойчивости растений к стрессам различной природы, в том числе к неблагоприятным низким температурам, благодаря своей способности регулировать баланс фитогормонов.

1.5. ВЫВОДЫ ИЗ ОБЗОРА ЛИТЕРАТУРЫ, ФОРМУЛИРОВКА ЦЕЛИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Температурный фактор играет важную роль в течение всего периода существования растений. Действию низких температур подвергается большая часть растений земного шара. Температура окружающей среды совместно с другими абиотическими факторами, в первую очередь с длительностью светового дня, определяет периоды вегетации и покоя растений. Очень часто при росте и развитии растений температура становится лимитирующим фактором, приводящим к их повреждениям или гибели. Реакция растений на снижение температуры и их способность адаптироваться к неблагоприятным температурам (закаливаться) генетически обусловлена и зависит от характера температурного режима, его продолжительности и интенсивности. Закаливание – сложный согласованный процесс, включающий изменения на физиологическом и биохимическом уровнях, приводящий к формированию приобретённой устойчивости растений к неблагоприятным температурам. Во время холодового закаливания происходит приостановка ростовых процессов растений, осуществляющаяся вследствие смещения гормонального баланса в сторону увеличения ингибиторов роста, главным образом АБК. У травянистых растений изменения на метаболическом уровне преимущественно направлены на избегание внутриклеточного льдообразования посредством увеличения проницаемости мембран для воды и оттока её в межклетники, а также на предотвращение излишнего обезвоживания клеток. Усиление проницаемости мембран достигается путём увеличения ненасыщенности жирных кислот мембранных липидов. Показано, что АБК способствует усилению активности

десатураз и, следовательно, увеличению степени ненасыщенности жирных кислот. Снижение содержания стерина в мембранах и индукция АБК-зависимых белков аквапоринов также увеличивают проницаемость мембран. Обезвоживание предотвращается повышением осмотического потенциала клетки при увеличении содержания криопротекторных веществ, осмолитов: водорастворимых углеводов и белков, пролина и других аминокислот, полиаминов. Белки могут выполнять и антифризную роль, защищая растения от внутриклеточного льдообразования. Выявлено, что при гипотермии в клетке экспрессируется обширная группа *cor*-генов, в том числе гены дегидринов. Доказано, что часть из них находится под контролем АБК. Накоплению сахаров при закаливании способствует сниженная интенсивность дыхания на фоне сохраняющегося фотосинтеза. Помимо этого на метаболизм углеводов влияет АБК, способствуя накоплению сахаров. Таким образом, АБК, являясь основным стрессовым ферментом, играет важную роль в формировании низкотемпературной адаптации растений.

Чтобы выжить в зимний период растениям необходимо свойство зимостойкости, которое помимо морозостойкости включает в себя устойчивость к выпреванию, выпиранию, вымоканию и другим факторам гибели, опосредованным неблагоприятной температурой.

Не менее важен процесс раззакаливания озимых при выходе из состояния вынужденного покоя и переходе к вегетации в весенний период. Имеющиеся по этому вопросу литературные данные относительно немногочисленны. Раззакаливание представляет собой процесс противоположный процессу закаливания. Скорость раззакаливания зависит от температуры окружающей среды и от эффективности закаливания растений. Когда растения переходят к активной вегетации, раззакаливание становится необратимым. При этом растения теряют приобретённую морозоустойчивость и могут погибнуть при возобновлении морозов. Поэтому в районах с неустойчивой погодой в период поздней зимы и ранней весны целесообразней возделывать сорта с более длительным периодом покоя и поздним сроком запуска раззакаливания.

Замедление ростовых процессов растений определяет их переход в состояние покоя и формирование устойчивости к неблагоприятным температурам. Ретарданты триазольной природы также способствуют замедлению роста растений, помимо этого показана их способность повышать концентрацию АБК, снижать содержание стероидов.

Анализ литературных данных показал, что относительно механизмов повышения холодо- и морозоустойчивости растений, успешного выхода растений из закалённого состояния и роли в этом процессе ретардантов триазольной природы имеется недостаточно сведений. Одним из представителей триазолов является тебуконазол, входящий в состав препаратов, широко применяемых в сельском хозяйстве. Поскольку тебуконазол эффективен против всех видов ржавчины зерновых культур, септориоза, подавляет головнёвые грибы, возбудителей корневых гнилей и плесневения семян он используется в основном как фунгицид профилактического и лечебного системного действия. Однако механизм его действия на растения и его участие в механизмах повышения холодо- и морозоустойчивости мало изучены. В связи с этим **целью** диссертационной работы было изучение изменений физиологических и биохимических параметров, определяющих холодо- и морозоустойчивость проростков злаков, выращенных из семян, обработанных тебуконазол-содержащим протравителем.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Растительный материал

В работе использовались этиолированные проростки мягкой яровой (сорт «Новосибирская 29»), озимой (сорт «Иркутская») пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и озимой ржи (*Secale cereale* L., сорт «Чулпан»).

Озимая рожь «Чулпан» является наиболее морозостойкой среди изучаемых злаков. Второе место занимает озимая пшеница «Иркутская», полученная благодаря многолетней работе специалистов Института цитологии и генетики СО РАН и Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН и обладающая высокой морозоустойчивостью (Дорофеев и др., 2004).

Подготовка семенного материала

Необходимое количество семян исследуемых злаков промывали тёплой водой и заливали 0,1% раствором перманганата калия, оставляя на 20-25 мин для дезинфекции. После семена отмывали проточной водой. Дальнейшая обработка и проращивание семян определялись условиями проводимых экспериментов.

2.2. Схема опытов

При проведении экспериментов использовали этиолированные проростки злаков разного возраста, которые выращивались в кюветах на фильтровальной бумаге. Готовили кюветы с подложкой, обёрнутой фильтровальной бумагой, кюветы для дезинфекции ошпаривали кипятком. Промытые семена пшеницы и ржи выкладывали на подложку сплошным слоем. Затем кюветы помещали в инкубатор MIR-154 («Sanyo», Япония), где семена яровой и озимой пшеницы и озимой ржи прорастали в темноте при температуре 24 °С. По мере необходимости в кюветы с проростками злаков подливали воду.

Обработка семян препаратом «Бункер»

В работе использовали тебуконазол-содержащий препарат «Бункер» (производитель ЗАО Фирма «Август») – водно-суспензионный концентрат, который является системным фунгицидом профилактического и лечебного действия для протравливания семян зерновых культур против семенной и

почвенной инфекций. Действующим веществом препарата является тебуконазол (содержание 60 г/л). Обработку промытых и просушенных семян протравителем проводили непосредственно перед их проращиванием. Для обработки семян использовали водный раствор препарата «Бункер» разной концентрации (0,5; 1; 1,5; 3; 4; 5 мкл/г семян). За счёт входящего в состав протравителя «Бункер» красителя семена окрашивались в красный цвет (рис. 5).

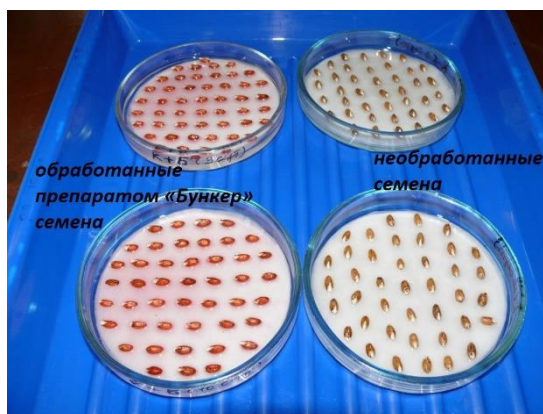


Рис. 5. Внешний вид обработанных и необработанных препаратом «Бункер» семян озимой пшеницы (сорт «Иркутская»)

Обработка этиолированных проростков злаков водными растворами тебуконазола и абсцизовой кислоты

Выращенные на воде двухсуточные этиолированные проростки злаков обрабатывали 0,1 мМ и 1 мМ растворами тебуконазола (Tebusconazol PESTANAL, “Sigma-Aldrich”, Германия) и абсцизовой кислоты (2-*cis*,4-*trans*-Absciscic acid, “Sigma-Aldrich”, Китай). Для приготовления растворов тебуконазола и АБК использовали раствор 0,1% DMSO. Воду из кювет заменяли свежеприготовленными растворами тебуконазола и АБК и выращивали проростки в течение суток (до трёхсуточного возраста) в темноте при 24 °С. Контролем служили двухсуточные проростки, которые в течение суток выращивали на растворе 0,1% DMSO. Затем растворы ингибиторов и DMSO сливали, проростки промывали водой и в дальнейшем выращивали на воде.

Холодовое закаливание этиолированных проростков злаков

Холодовое закаливание трёхсуточных этиолированных проростков злаков проводили в темноте при температуре 2 °С в течение семи суток, помещая

кюветы с проростками в инкубатор MIR-154 или в камеру тепла/холода МКТ-240 (“Binder”, Германия). Холодовому закаливанию подвергали проростки как из необработанных, так и из обработанных препаратом «Бункер» семян, а также проростки, выдержанные в течение суток на водном растворе тебуконазола.

Определение морозоустойчивости этиолированных проростков злаков

При проведении опытов по оценке морозоустойчивости в лабораторных условиях использовали инкубатор MIR-154. Холодозакалённые этилированные проростки из необработанных и обработанных препаратом «Бункер» семян промораживали при температурах -6 , -7 или -8 °C в течение суток. Затем температуру на сутки повышали до 2 °C. После этого температуру повышали до 24 °C и оставляли растения в темноте отрастать в течение семи суток. Количество выживших после промораживания и последующего отрастания растений выражали в процентах от общего числа проростков.

При проведении экспериментов по оценке морозоустойчивости на базе ЦКП СИФИБР СО РАН «Фитотрон» использовали камеру тепла/холода МКТ-240. Кюветы с двухсуточными этиолированными проростками злаков из необработанных и обработанных препаратом «Бункер» семян (выращенные в инкубаторе MIR-154 при 24 °C) переносили в камеру МКТ-240 и выращивали до трёхсуточного возраста (в течение суток) при 24 °C. Вместе с кюветами в камеру помещали пластиковые контейнеры с проростками, которые использовались для оценки морозоустойчивости (рис. 6).



Рис. 6. Кюветы и контейнеры с проростками злаков в камере тепла/холода МКТ-240 (“Binder”, Германия)

Данные проростки в двухсуточном возрасте помещали во влажные марлевые мешочки (по 30 штук в трёх повторностях), мешочки помещали в контейнеры.

Относительную морозоустойчивость этиолированных проростков как из необработанных, так и из обработанных препаратом «Бункер» семян определяли путём ступенчатого промораживания образцов (Самыгин, 1967), моделируя условия закаливания и раззакаливания проростков. Для этого сначала в течение семи суток при температуре 2 °С проводили холодное закаливание трёхсуточных этиолированных проростков злаков, выращенных из необработанных и обработанных препаратом «Бункер» семян. Затем закалённые проростки промораживали при температурах –2, –4, –6, –8, –10 °С. Снижение температуры происходило со скоростью 1 °С/ч один раз в сутки. После этого температуру повышали (со скоростью 1 °С/ч один раз в сутки), моделируя условия раззакаливания: –8, –6, –4, 0, 4 °С (продолжительность обработки каждой температурой составляла 24 ч за исключением обработок температурами –8 и 4 °С, которые длились 12 ч). Далее температуру понижали до –6 °С на 24 ч (моделируя условия заморозок после потепления), затем для постепенного оттаивания проростков температуру на сутки поднимали до 2 °С, после чего проростки оставляли на отрастание при 24 °С в течение семи суток. Температурами, после действия которых контейнеры с проростками забирали из экспериментальной камеры и оставляли для отрастания и оценки морозоустойчивости, были: –6, –8, –10 °С (использовались для промораживания закалённых проростков) и –6 °С (использовалась для промораживания раззакалённых проростков). Контейнеры с проростками переносили в инкубатор MIR-154, где выдерживали в течение суток при 2 °С для оттаивания, а затем оставляли на отрастание в течение семи суток при 24 °С. Морозоустойчивость определяли с помощью подсчёта выживших проростков после отрастания.

Проростки, выращенные и прошедшие холодные обработки в кюветах, использовались в качестве материала для изучения белкового, жирнокислотного, углеводного составов и для анализа дыхательной активности проростков.

Исследование данных параметров проводилось на холодозакалённых проростках и на раззакалённых проростках после действия температур 4 и –6 °С (после действия температуры –6 °С белковый и жирнокислотный составы не изучались).

2.3. Изучение ростовых процессов

Изучение ростовых процессов у незакалённых этиолированных проростков злаков использовали для оценки ингибирующего рост действия тебуконазол-содержащего протравителя семян «Бункер», АБК и тебуконазола. В качестве контроля выступали проростки, не подвергнутые обработке данными веществами. Замер длины coleoptилей злаков осуществляли на 5-е сутки роста. Проводили три-четыре независимых повторности (по 30-50 проростков на одну повторность). Степень ингибирования роста (I, %) определяли по формуле (1) (Иванов, 1974):

$$I = \frac{\Delta L_k - \Delta L_t}{\Delta L_k} \times 100\% \quad (1),$$

где ΔL_k – средний прирост coleoptилей проростков, не подвергнутых обработке ингибиторами, мм; ΔL_t – средний прирост coleoptилей проростков, подвергнутых обработке ингибиторами, мм.

2.4. Определение жизнеспособности клеток coleoptилей

Для определения жизнеспособности клеток coleoptилей этиолированных проростков злаков использовали метод восстановления красителя 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида (ТТХ). Соли тетразолия широко используются для оценки жизнеспособности, окислительно-восстановительного потенциала клеток, цитотоксичности и пролиферации. При восстановлении эти водорастворимые, бесцветные составы превращаются в незаряженные, ярко окрашенные формазаны (Еникеев и др., 1995).

Исследуемую ткань (100 мг колеоптилей) инфильтровали в шприце (Александров, 1954) раствором 0,05 N KH_2PO_4 , содержащего 0,5% ТТХ (рН 7,0). Инфильтрованные колеоптили помещали в микропробирку типа Эппендорф, заливали 1,5 мл буфера и инкубировали в течение суток при анаэробных условиях в темноте при 24 °С. Затем краситель удаляли трёхкратным промыванием дистиллированной водой. Формазан (продукт восстановления ТТХ) экстрагировали 1,5 мл 96% этилового спирта в течение 15 мин на термостатируемом шейкере TS-100 (“Biosan”, Латвия) при 60 °С. Концентрацию формазана (на г сырого веса) рассчитывали по оптической плотности раствора, которую определяли спектрофотометрически при длине волны 490 нм.

2.5. Определение содержания водорастворимых углеводов

Для определения количественного содержания водорастворимых углеводов в побегах этиолированных проростков злаков использовали антроновый реактив (0,2% антрон в концентрированной серной кислоте) – аналитический реагент для обнаружения углеводов (Дише, 1967). Спектрофотометрический метод Дише основан на способности водных растворов углеводов в присутствии концентрированной серной кислоты с антроном окрашиваться в сине-зелёные продукты.

Высушенный до постоянного веса при температуре 72 °С исследуемый материал (побеги этиолированных проростков злаков) растирали в ступке до порошкообразного состояния. Для экстрагирования водорастворимых углеводов 5-7 мг сухого растёртого материала переносили в пробирки, заливали кипящей водой (10 мл). Пробирки с экстрактом оставляли на сутки в термостатируемой камере при 24 °С. Затем отбирали аликвоту супернатанта, добавляли удвоенный объём раствора антрона в концентрированной серной кислоте и через 15 мин плотность окрашенного раствора измеряли спектрофотометрически при длине волны 620 нм. В качестве контроля использовали бидистиллированную воду с антроновым реактивом. Содержание водорастворимых углеводов рассчитывали

по калибровочной кривой, построенной по сахарозе, и выражали в % от воздушно-сухого веса.

2.6. Анализ жирнокислотного состава

Для изучения жирнокислотного состава этиолированных незакалённых и закалённых проростков злаков, выращенных из семян, обработанных и необработанных препаратом «Бункер», анализировали метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК). Исследуемый материал по 1 г замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C . Затем образцы растирали в ступке с жидким азотом до порошкообразного состояния. Для экстрагирования липидов использовали смесь хлороформ : метанол в соотношении 2 : 1 (Bligh and Dyer, 1959). Роторный испаритель ИР-1ЛТ (“Labtex”, Россия) использовали для удаления под вакуумом хлороформа из липидного экстракта. Хлороформные экстракты липидов хранили при -20°C с добавлением ионола до концентрации 0,05% (Кейтс, 1975). При экстракции липидов из исследуемых объектов использовали модифицированный метод Фолча (Christie, 1993). В течение 30 мин на водяной бане при $55-60^{\circ}\text{C}$ проводили кислотный метанолиз суммарной фракции липидов (с помощью 1% метанольного раствора серной кислоты). После охлаждения МЭЖК трижды экстрагировали гексаном (Christie, 1993). Затем на алюминиевых пластинах с силикагелем Sorbfil ПТСХ-АФ-В (Россия) в камере с бензолом проводили дополнительную очистку МЭЖК методом тонкослойной хроматографии. Анализ МЭЖК проводили методом газожидкостной хроматографии на хромато-масс-спектрометре 5973N/6890N MSD/DS (“Agilent Technologies”, США). Способ ионизации – электронный удар (EI), детектор масс-спектрометра – квадруполь, энергия ионизации 70 эВ. При анализе использовался режим регистрации полного ионного тока. Хроматографическое разделение липидов проводили в изократическом режиме при 200°C . Для разделения использовали капиллярную колонку HP-INNOWAX ($30\text{ см} \times 250\text{ мкм} \times 0,50\text{ мкм}$). В качестве неподвижной фазы выступал полиэтиленгликоль, подвижной фазы – гелий (скорость потока газа 1 мл/мин). Поддерживалась

температура испарителя 250 °С, детектора – 150 °С, источника ионов – 230 °С, температура линии, соединяющей хроматограф с масс-спектрометром, составляла 280 °С. Диапазон сканирования 41-450 а.е.м. Объём вводимой пробы – 1 мкл, разделение потоков 5 : 1.

Для идентификации МЭЖК проводили расчёт эквивалентной длины алифатической цепи (ECL), использовали библиотеки масс-спектров NIST 05, Christie и сравнение времени удерживания со временем удерживания стандартных соединений. Относительное содержание жирных кислот определяли в весовых процентах (вес. %) от общего их содержания в образце.

Для оценки степени ненасыщенности жирных кислот рассчитывали индекс двойной связи (ИДС) по формуле (2) (Lyons et al., 1964):

$$\text{ИДС} = \sum P_j \cdot n / 100 \quad (2),$$

где P_j – содержание жирных кислот (вес, %); n – количество двойных связей в каждой кислоте.

Рассчитывали сумму ненасыщенных жирных кислот ($\Sigma_{\text{ннжк}}$), сумму насыщенных жирных кислот ($\Sigma_{\text{нжк}}$) и отношение суммы ненасыщенных жирных кислот к сумме насыщенных жирных кислот ($\Sigma_{\text{ннжк}}/\Sigma_{\text{нжк}}$).

2.7. Выделение митохондрий

Выделение митохондрий из побегов трёхсуточных этиолированных проростков злаков проводили в специально оборудованном криостате при температуре 0-4 °С (Войников, 1980). Гомогенизацию растительного материала проводили с помощью металлического пресса, используя охлаждённую среду выделения (300 мМ сахара, 40 мМ MOPS-KOH (pH 7,36), 10 мМ KCl, 2 мМ ЭДТА, 1 мМ MgCl₂, 0,5% цистеин, 0,1% бычий сывороточный альбумин – БСА), в соотношении растительный материал, г : среда выделения, мл – 1 : 4. Полученный гомогенат отфильтровывали через капроновую ткань, для осаждения крупных клеточных фрагментов и ядер центрифугировали 4 мин при

5000 g на высокоскоростной центрифуге Allegra 64R (“Beckman Coulter”, США) при 4 °C. Далее использовали супернатант, митохондрии из которого осаждали центрифугированием при 15000 g в течение 3 мин. Осадок митохондрий промывали средой «промывания» (pH 7,36) – среда выделения без цистеина. После чего митохондрии вновь центрифугировали при 15000 g в течение 3 мин. Полученный осадок митохондрий ресуспендировали в среде «ресуспендирования» (pH 7,36) – среда промывания с добавлением 0,1% БСА. Митохондриальную суспензию хранили в пробирке во льду и использовали для анализа энергетической активности (Побежимова и др., 2004).

2.8. Полярографический анализ

Полярографическим методом определяли окислительную и фосфорилирующую активность митохондрий, а также интенсивность дыхания побегов этиолированных проростков злаков. Для полярографического анализа использовали платиновый электрод закрытого типа (электрод Кларка) и полярограф Oxytherm system (“Hansatech Inst.”, Англия), используя объём ячейки 1,4 мл. Температура 26 °C в ячейке поддерживалась автоматически согласно установленной программе. Исследуемый материал (суспензию митохондрий или измельчённые отрезки инфильтрованных растительных тканей) добавляли в полярографическую ячейку со средой инкубации.

Среда инкубации для определения окислительной и фосфорилирующей активности митохондрий содержала 300 mM сахарозу, 18 mM KH_2PO_4 (pH 7,36), 1 mM MgCl_2 , 5 mM ЭДТА. Количество митохондриального белка в суспензии определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1951). Суспензию митохондрий вносили в полярографическую ячейку со средой инкубации, в которую был добавлен субстрат окисления. В качестве субстратов окисления использовали 10 mM малат в присутствии 10 mM глутамата; 8 mM сукцинат в присутствии 5 mM глутамата и 3 мкМ ротенона; 1 mM НАД·Н; 2 mM аскорбат плюс 0,2 mM тетраметил-п-фенилендиамин (ТМФД). Глутамат добавляли для устранения оксалоацетатного ингибирования. При окислении НАД·Н из состава среды

инкубации исключали ЭДТА и для активации «внешней» rotenon-нечувствительной НАД·Н дегидрогеназы включали 0,06 мМ CaCl₂ (Møller et al., 1981). Для инициирования энергетической активности митохондрий в ячейку вносили АДФ. Конечная концентрация АДФ в ячейке была 100-200 мкМ. В качестве ингибитора цитохромного пути транспорта электронов использовали цианид калия (0,4 мМ KCN, ингибитор цитохром *c* оксидазы), а альтернативного пути – бензгидроксамовую кислоту (1 мМ БГК, ингибитор альтернативной цианид-резистентной оксидазы), которые добавляли в состоянии 3 (V₃).

Используя полярографические данные рассчитывали параметры окисления и фосфорилирования митохондрий:

1. отношение АДФ:О (Estabrook, 1967), нмоль АДФ/ наноатомы O₂, – отношение фосфорилированного АДФ к количеству утилизированного при этом кислорода;

2. коэффициент дыхательного контроля по Чансу и Вильямсу (КДК) – отношение скорости дыхания в состоянии 3 к скорости дыхания в состоянии 4 в данном цикле фосфорилирования – вычисляли по формуле (3) (Chance and Williams, 1956):

$$\text{КДК} = V_3/V_4 \quad (3),$$

где V₃ – состояние 3 – скорость поглощения кислорода при фосфорилировании АДФ, нмоль O₂/мин/мг белка; V₄ – состояние 4 – скорость поглощения кислорода после истощения АДФ, нмоль O₂/мин/мг белка (Estabrook, 1967).

Интактность внешней митохондриальной мембраны рассчитывали по скорости аскорбат-зависимого цитохром *c*-стимулируемого KCN-чувствительного поглощения кислорода (Шугаев и др., 2012) в отсутствие и в присутствии 0,04% Тритона X-100 (Davy de Virville et al., 1994) – детергента, нарушающего целостность мембран митохондрий. Использовали 60 мМ аскорбат, 30 мкМ цитохром *c*, 0,4 мМ KCN.

В работе определяли интенсивность дыхания побегов этиолированных проростков злаков по скорости поглощения кислорода отрезками тканей. При этом навеску исследуемой ткани (100 мг) инфильтровали в шприце раствором среды инкубации (Александров, 1954), содержащей 50 мМ KH_2PO_4 (pH 7,2) и 50 мМ сахарозу. В качестве ингибиторов дыхания в полярографическую ячейку с растительной тканью последовательно добавляли 0,8 мМ KCN и 2 мМ БГК. Поглощение кислорода, оставшееся после добавления KCN и БГК, считали неспецифическим и не принимали в расчёт дыхательной активности. Интенсивность дыхания выражали в нмоль поглощённого кислорода в мин на г сырого веса, учитывая растворимость кислорода в воде.

2.9. Экстракция суммарного клеточного, цитоплазматического и митохондриального белка

Для выделения суммарного клеточного белка исследуемый материал (побеги или coleoptili этиолированных проростков злаков) по 1 г замораживали в жидком азоте и хранили при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Затем образцы растирали в ступке с жидким азотом до порошкообразного состояния в 4 мл охлаждённого буфера для выделения белка (соотношение растительный материал, г : буфер для гомогенизации, мл – 1 : 4): 100 мМ Трис-HCl (pH 7,6), 1 мМ β -меркаптоэтанол, 1 мМ ФМСФ (Побежимова и др., 2004). Гомогенизацию проводили в холодной комнате при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. После гомогенизации исследуемого материала грубые клеточные компоненты удаляли центрифугированием при 15000 g в течение 20 мин на высокоскоростной центрифуге Allegra 64R (“Beckman Coulter”, США) при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Белок из супернатанта осаждали двукратным объёмом охлаждённого при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ацетона и оставляли на 30-60 мин в морозильной камере. Осаждённый белок отделяли центрифугированием при 10000 g в течение 10 мин, белок растворяли в 400 мкл буфера для образца (“Sample Buffer”, SB: 62,5 мМ Трис-HCl (pH 6,8), 1 мМ ЭДТА, 10% ДДС, 20% глицерин, 5% β -меркаптоэтанол), инкубировали 7 мин при $97\text{ }^{\circ}\text{C}$ на термостатируемом шейкере TS-100 (“Biosan”, Латвия) и центрифугировали 15 мин при 10000 g на микроцентрифуге MiniSpin

(“Eppendorf”, Германия). Супернатант переносили в микропробирки типа Эппендорф.

Цитоплазматический белок осаждали ацетоном в соотношении 1 : 2 из супернатанта после второго центрифугирования при выделении митохондрий. Белки из митохондрий и цитоплазматические белки экстрагировали, растворяя образцы в SB с последующим нагреванием образцов при 97 °C на термостатируемом шейкере TS-100 (“Biosan”, Латвия) в течение 7 мин и центрифугированием при 10000 g в течение 15 мин на микроцентрифуге MiniSpin (“Eppendorf”, Германия).

Полученные суммарный клеточный, цитоплазматический и митохондриальный белки переносили в микропробирки типа Эппендорф и брали аликвоту (5 мкл) на определение количества белка по методу Лоури (Lowry et al., 1951). В образцы добавляли бромфеноловый синий в расчёте 10 мкл маточного раствора (0,1%) на 100 мкл образца. Выделенные белки хранили в морозильной камере и использовали для электрофоретического разделения и вестерн-блоттинга.

2.10. Денатурирующий гель-электрофорез

Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) проводили, используя прибор для электрофореза Mini-PROTEAN III Electrophoretic Cell (“Bio-Rad”, США) в блоках полиакриламидного геля размером 70×80×1 мм в модифицированной системе Лэммли (Laemmli, 1970). Обезжиренные 70% этанолом стеклянные пластины (83×101 мм и 73×101 мм) помещали в устройство для заливки геля. В просвет между стёклами заливали раствор мелкопористого полиакриламидного геля (рабочий, или разделяющий гель, концентрация полиакриламида в котором была 12,5% или 15%). Рабочий гель полимеризовали в 37,5 mM Трис-HCl буфере (pH 8,8), содержащем 0,1% ДДС. Полимеризацию геля инициировали добавлением к раствору свежеприготовленного персульфата аммония вместе с N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамином. Для лучшей полимеризации и создания

ровной верхней границы разделяющего геля на него наслаивали изобутанол, насыщенный водой. После полимеризации рабочего геля заливали крупнопористый (формирующий) гель. Формирующий гель полимеризовали в 62,5 мМ Трис-HCl буфере (pH 6,8), содержащем 0,1% ДДС. В верхний гель погружали зубчатый шаблон («гребёнка») для формирования карманов для нанесения белковых проб. Белковые пробы наносили на гель, предварительно выровняв их концентрации по методу Лоури (Lowry et al., 1951), не более 25-30 мкг белка на трек (не более 6 мкл образца). Буфер трис-глицин (25 мМ Трис-HCl (pH 8,3), 192 мМ глицин), содержащий 0,1% ДДС, выступал в качестве верхнего и нижнего электродного буфера. В первые полчаса, когда образцы входят в гель, на блоке устанавливали напряжение 50 В. Далее электрофорез проводили при напряжении 180 В пока бромфеноловый синий (свидетель) не доходил до конца геля. После окончания электрофореза гель для окрашивания выдерживали 15-30 мин в водном растворе, содержащем 0,1% Кумасси R-250, 25% изопропанол, 10% уксусную кислоту. Затем гель переносили в раствор, содержащий 12,5% изопропанол и 7% уксусную кислоту, и отмывали в течение нескольких часов для обесцвечивания фона (Побежимова и др., 2004). Полученные таким образом гели использовали для оценки качества разделения белков. Неокрашенные гели после электрофореза использовали для проведения вестерн-блоттинга.

2.11. Вестерн-блоттинг

Блоттинг представляет собой перенос разделённых белков из толщины геля на плоский носитель (например нитроцеллюлозную мембрану). В настоящее время наиболее распространён электрофоретический блоттинг (проводится наложением тока перпендикулярно поверхности подложки), а именно иммуноблоттинг, включающий в себя иммобилизацию белков на нитроцеллюлозной мембране с последующим выявлением анализируемых белков при помощи специфических антител и иммуноферментного анализа. При вестерн-блоттинге белки предварительно разделяются электрофоретически в полиакриламидном геле (Побежимова и др., 2004).

В нашей работе блоттинг проводили в холодной комнате при 4 °C в течение 2,5 ч, выставляя напряжение 200 В в течение первых 30 мин, а затем 400 В. Для переноса анализируемых белков на нитроцеллюлозную мембрану Amersham Protran Premium 0,45 NC (“GE Healthcare Life Sciences”, Германия) использовали специальный прибор для «мокрого» блоттинга Mini Trans-Blot (“Bio-Rad”, США). При этом «сэндвич» из прокладок, двух листов ватмана, геля и мембраны помещали вертикально между платиновыми электродами в ёмкость с охлаждённым буфером. Буфер для переноса (Towbin-буфер) содержал 25 мМ Трис-НСl (pH 8,3), 192 мМ глицина, 10% метанол. По окончании переноса мембрану помещали в раствор 0,5% красителя Понсо в водном растворе 0,1% уксусной кислоты на 1 мин для выявления маркерных белков (“Thermo Scientific”, Литва) и направления треков, после чего мембрану тщательно отмывали дистиллированной водой. Для блокирования на мембране оставшихся несвязанными с белками после переноса центров и предотвращения неспецифического связывания первичных антител нитроцеллюлозную мембрану помещали в блокирующий раствор, содержащий TBS (10 мМ Трис-НСl (pH 7,4), 150 мМ NaCl), 2% сухое обезжиренное молоко, 0,2% азид натрия, и оставляли на 12 ч при 0-4 °C. Затем мембрану дважды отмывали TBS от блокирующего раствора в течение 20 мин на минирокере MR-1 (“BioSan”, Латвия). Далее мембрану инкубировали в растворе первичных антител в TBS в течение часа. Использовали поликлональные антитела против цитохрома c в разведении 1 : 500 («Биосан», Россия) и против дегидринов (антитела против синтетического пептида, содержащего последовательность KIKEKLPG, являющуюся частью K-сегмента дегидринов) в разведении 1 : 1000 (ADI-PLA-100, “StressGen”, США). После инкубации мембрану дважды отмывали по 10 мин от несвязавшихся антител в TTBS (раствор TBS, содержащий 0,05% Tween-20). Затем мембрану заливали раствором вторичных антител (антикроличьи в разведении 1 : 2500), конъюгированных со щелочной фосфатазой, и инкубировали на минирокере в течение часа. После инкубации мембрану трижды отмывали в TTBS от непрореагировавших антител по 5 мин. В течение 5 мин мембрану оставляли на

минирокере в растворе буфера pH 9,5, содержащем 100 мМ Трис-HCl (pH 9,5), 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂. Затем мембрану помещали в раствор буфера pH 9,5 с 0,17 мг/мл 5-бromo-4-хлоро-3-индолил фосфата и 0,33 мг/мл нитротетразолия синего, инкубировали до проявления окраски. После чего мембрану отмывали дистиллированной водой, высушивали, сканировали и хранили в темноте.

2.12. Список использованных реактивов

АБК (2-*cis*,4-*trans*-Absciscic acid) – «Sigma-Aldrich» (Китай); АДФ (Adenosine 5'-diphosphate sodium salt) – «Sigma» (США); акриламид (Acrylamide) – «GERBU» (Германия); антрон (Anthrone) – «Sigma-Aldrich» (Испания); аскорбиновая кислота (Ascorbic acid) – «Sigma-Aldrich» (Германия); БГК (Benzhydroxamic acid) – «Sigma-Aldrich» (США); бис-акриламид (Bis-Acrylamide) – «Helicon» (Россия); БСА – «MP Biomedicals, Inc.» (Франция); «Бункер» – «Август» (Россия); глицин (Glycine) – «Helicon» (Россия); глутамат (Monosodium glutamate) – «Sigma» (Германия); ДДС (Sodium dodecyl sulfate) – «MP Biomedicals, Inc.» (Франция); Кумасси (Coomassie Brilliant Blue R 250) – «Sigma» (США); малат (Malic acid) – «Sigma-Aldrich» (Германия); НАД·Н – «ICN Biomedicals, Inc.» (США); персульфат аммония (Ammonium persulfate) – «MP Biomedicals, LLC.» (США); Понсо (Ponceau S) – «MP Biomedicals, Inc.» (Франция); ротенон (Rotenone) – «Sigma» (Германия); сукцинат (Succinic acid) – «Fluka» (Япония); тебуконазол (Tebuconazol PESTANAL) – «Sigma-Aldrich» (Германия); трис (Tris X) – «GERBU» (Германия); тритон X-100 (Triton X-100) – «Ferak Berlin» (Германия); цистеин (Cysteine) – «ICN Biomedicals, Inc.» (США); цитохром *c* (Cytochrome *c*) – «ICN Biomedicals, Inc.» (США); BCIP – «Thermo Scientific» (Литва); DMSO (Dimethyl sulfoxide) – «Sigma-Aldrich» (Франция); EDTA (Disodium salt dihydrate EDTA) – «Helicon» (Россия); KCN – «Sigma» (Германия); MOPS – «AppliChem» (Германия); NBT – «Thermo Scientific» (Литва); TEMED – «MP Biomedicals, Inc.» (Франция); Tween-20 – «GERBU Biotechnik GmbH» (Германия). Остальные реактивы были отечественного производства квалификации ч.д.а., х.ч. и о.с.ч.

2.13. Статистическая обработка данных

Для проведения статистической обработки данных использовали программный пакет SigmaPlot 12.5. Эксперименты проводили не менее чем в трёх независимых повторностях. «*n*» (в подписях к рисункам) означает количество независимых повторностей.

Полученные данные представляли в виде средней арифметической (*M*) или медианы (*Me*), а разброс значений – в виде стандартного отклонения ($\pm S.D.$) или интерквартильной широты [25%;75% процентиль] (Гланц, 1999).

С помощью критерия Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk) проверяли нормальность распределения (ГОСТ Р ИСО 5479-2002).

При нормальном распределении для доказательства наличия значимых различий между средними применяли однофакторный дисперсионный анализ с последующим множественным сравнением средних по методу LSD (Least Significant Difference) Фишера – метод группирования выборок с наименьшей значимой разностью.

Если распределение отличалось от нормального, для доказательства наличия значимых различий использовали *H*-критерий Краскела-Уоллиса (Трухачёва, 2013).

Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $P \leq 0,05$ (Гланц, 1999).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. ТЕБУКОНАЗОЛ-СОДЕРЖАЩИЙ ПРОТРАВИТЕЛЬ СЕМЯН «БУНКЕР» ЭФФЕКТИВНО ИНГИБИРУЕТ РОСТОВЫЕ ПРОЦЕССЫ ПРОРОСТКОВ ЗЛАКОВ, НО НЕ ОКАЗЫВАЕТ ФИТОТОКСИЧНОГО ДЕЙСТВИЯ НА КЛЕТКИ РАСТЕНИЙ

В работе использовали препарат «Бункер» – системный фунгицид (водно-суспензионный концентрат) для протравливания семян профилактического и лечебного действия (рис. 7). Рекомендованная концентрация протравителя для достижения фунгицидного эффекта при обработке семян злаков – 0,5 л/т семян. Для проведения экспериментов проводили пересчёт на вес семян в граммах (мкл/г). Действующим веществом протравителя является производное 1,2,4-триазола – тебуконазол (1-(4-хлорфенил)-4,4-диметил-3-(1H-1,2,4-триазол-1-илметил)-3-пентанол) (рис. 8), концентрация тебуконазола в препарате 60 г/л.



Рис. 7. Протравитель семян «Бункер» (ЗАО Фирма «Август»)

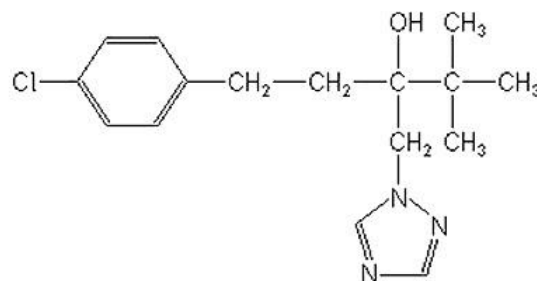


Рис. 8. Тебуконазол (1-(4-хлорфенил)-4,4-диметил-3-(1H-1,2,4-триазол-1-илметил)-3-пентанол)

Тебуконазол (ингибитор C¹⁴-деметилования) эффективен против всех видов ржавчины зерновых культур, септориоза, подавляет головнёвые грибы, возбудителей корневых гнилей и плесневения семян. Используется в основном как фунгицид, обладающий профилактическим и лечебным системным действием. Относится к 3 классу опасности (умеренно опасный) для человека по

ингаляционной токсичности (Попов и др., 2003). Помимо фунгицидных свойств, как и все производные триазола, тебуконазол обладает ретардантными свойствами (Прусакова и Чижова, 1998).

3.1.1. Влияние протравителя семян «Бункер», тебуконазола и экзогенной абсцизовой кислоты на рост coleoptилей побегов злаков

Для подтверждения данных, имеющихся в литературе, относительно наличия у тебуконазола ретардантных свойств (Прусакова и Чижова, 1998), было изучено влияние тебуконазол-содержащего препарата «Бункер» на длину coleoptилей этиолированных проростков яровой пшеницы, озимой пшеницы и озимой ржи. Параллельно с изучением ретардантных свойств, осуществлялся подбор рабочей концентрации протравителя «Бункер» для проведения дальнейших исследований. Экспериментальный подбор концентрации препарата был необходим, поскольку в сельском хозяйстве протравитель «Бункер» используется в качестве фунгицида (Попов и др., 2003), и в инструкции по его применению приводится лишь рекомендованная концентрация для достижения фунгицидного эффекта (0,5 л/т семян).

При изучении ингибирующего рост действия препарата «Бункер» измеряли длину coleoptилей пятисуточных этиолированных проростков злаков, выращенных из необработанных семян (контроль), и coleoptилей пятисуточных этиолированных проростков злаков, выращенных из семян, обработанных протравителем «Бункер» разной концентрации: 0,5, 1, 1,5, 3, 4 и 5 мкл/г семян. Длина coleoptиля контрольных проростков принималась за 100% и составляла в среднем для проростков яровой пшеницы 53 ± 4 мм, озимой пшеницы – 51 ± 3 мм, озимой ржи – 64 ± 4 мм. На рисунке 9 представлено изменение длин coleoptилей проростков злаков (% от контроля), выращенных из семян, обработанных протравителем «Бункер» разной концентрации. Степень ингибирования ростовых процессов coleoptилей проростков злаков из обработанных препаратом «Бункер» семян определяли относительно контрольных проростков злаков и выражали в процентах.

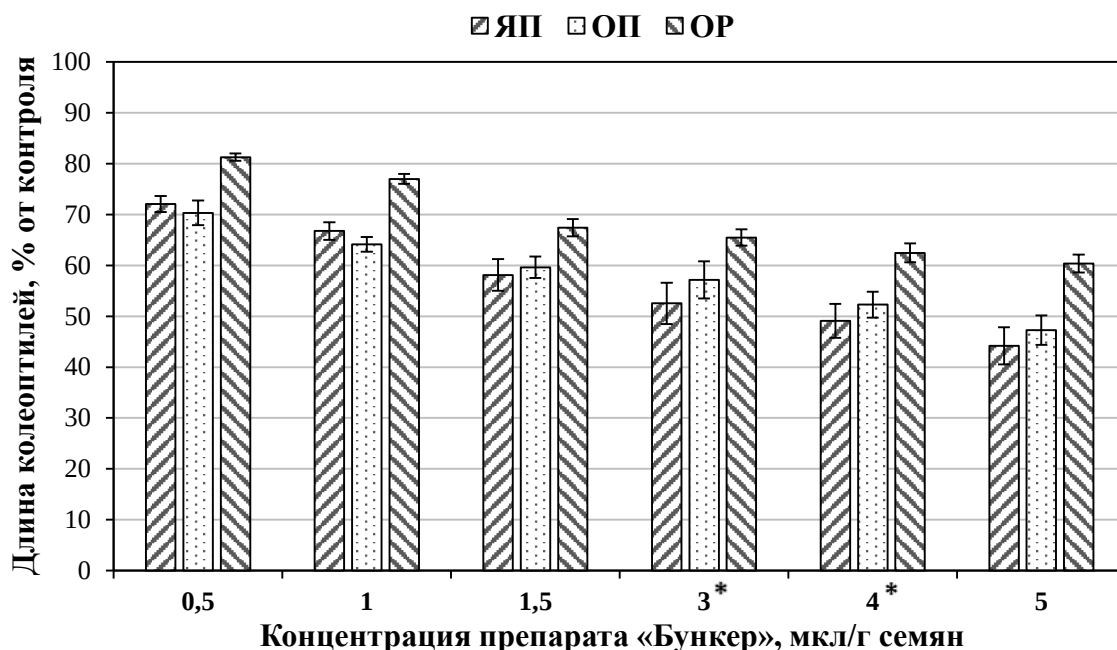


Рис. 9. Влияние препарата «Бункер» на рост coleoptилей побегов злаков
Примечание: $n=4$. $M \pm S.D.$ * – между вариантами 3 и 4 (мкл/г семян) не обнаружено статистически значимых отличий для каждого злака, в остальных случаях отличия значимы ($P < 0,05$). Статистическую значимость отличий определяли по методу LSD Фишера.
Обозначения: ЯП – яровая пшеница; ОП – озимая пшеница; ОР – озимая рожь.

Тебуконазол-содержащий препарат «Бункер» оказывал ингибирующее рост действие на все исследуемые злаки, но в большей степени препарат вызывал ингибирование длины coleoptилей проростков яровой и озимой пшеницы, тогда как ретардантный эффект на проростках озимой ржи был менее выражен. Степень ингибирования длины coleoptилей проростков злаков возрастала с увеличением концентрации препарата. Так, концентрация протравителя 0,5 мкл/г семян вызывала ингибирование длины coleoptилей проростков яровой пшеницы, озимой пшеницы и озимой ржи на 28%, 30%, 19%, концентрация 1 мкл/г семян – на 33%, 36%, 23%, концентрация 1,5 мкл/г семян – на 42%, 40%, 33%, концентрация 3 мкл/г семян – на 47%, 43%, 34%, концентрация 4 мкл/г семян – на 51%, 48%, 37%, концентрация 5 мкл/г семян – на 56%, 53%, 40%, соответственно.

Для проведения дальнейших исследований в качестве рабочей концентрации протравителя «Бункер», вызывающей ингибирование длины coleoptилей проростков злаков, была выбрана концентрация 1,5 мкл/г семян.

Степень ингибирования длины coleoptилей при данной концентрации препарата «Бункер» статистически значимо отличалась от величины ингибирования, соответствующей концентрациям 0,5, 1 и 3 мкл/г семян, тогда, как между концентрациями 3 и 4 мкл/г семян не было обнаружено статистически значимых отличий. С точки зрения экологической безопасности и экономической выгоды целесообразней использовать меньшую концентрацию препарата, в нашем случае – 1,5 мкл/г семян.

Чтобы подтвердить, что ингибирование роста coleoptилей вызывает именно тебуконазол, входящий в состав препарата «Бункер», изучили влияние синтетического тебуконазола (Tebuconazol PESTANAL, “Sigma-Aldrich”, Германия) на изменение длины coleoptилей этиолированных проростков яровой пшеницы, озимой пшеницы и озимой ржи.

Известно, что в естественных условиях торможение роста растений осуществляется природными ингибиторами, например АБК, также известно, что экзогенная АБК приводит к торможению ростовых процессов (Кефели, 1997; Титов и Таланова, 2009; Косулина и др., 2011; Thomashow, 1999; Parent et al., 2009). В связи с этим для сравнения ингибирующего эффекта синтетического регулятора роста (тебуконазола) и природного было также изучено влияние экзогенной АБК (2-*cis*,4-*trans*-Absciscic acid, “Sigma-Aldrich”, Китай) на изменение длины coleoptилей этиолированных проростков яровой пшеницы, озимой пшеницы и озимой ржи.

Проростки яровой пшеницы, озимой пшеницы и озимой ржи выращивали на воде в темноте при температуре 24 °С (контрольные условия) до двухсуточного возраста. Затем воду заменяли 0,1 мМ и 1 мМ растворами АБК и тебуконазола и проростки выращивали в течение суток. После чего растворы ингибиторов заменяли водой и проростки злаков оставляли на двое суток для отрастания в контрольных условиях. Замер длины coleoptилей этиолированных проростков яровой пшеницы, озимой пшеницы и озимой ржи проводили в пятисуточном возрасте и сравнивали с длиной coleoptилей пятисуточных необработанных проростков (контрольные проростки). Степень ингибирования

роста coleoptiles проростков злаков, обработанных растворами АБК и тебуконазола, определяли относительно длины coleoptiles контрольных проростков злаков и выражали в процентах (рис. 10).

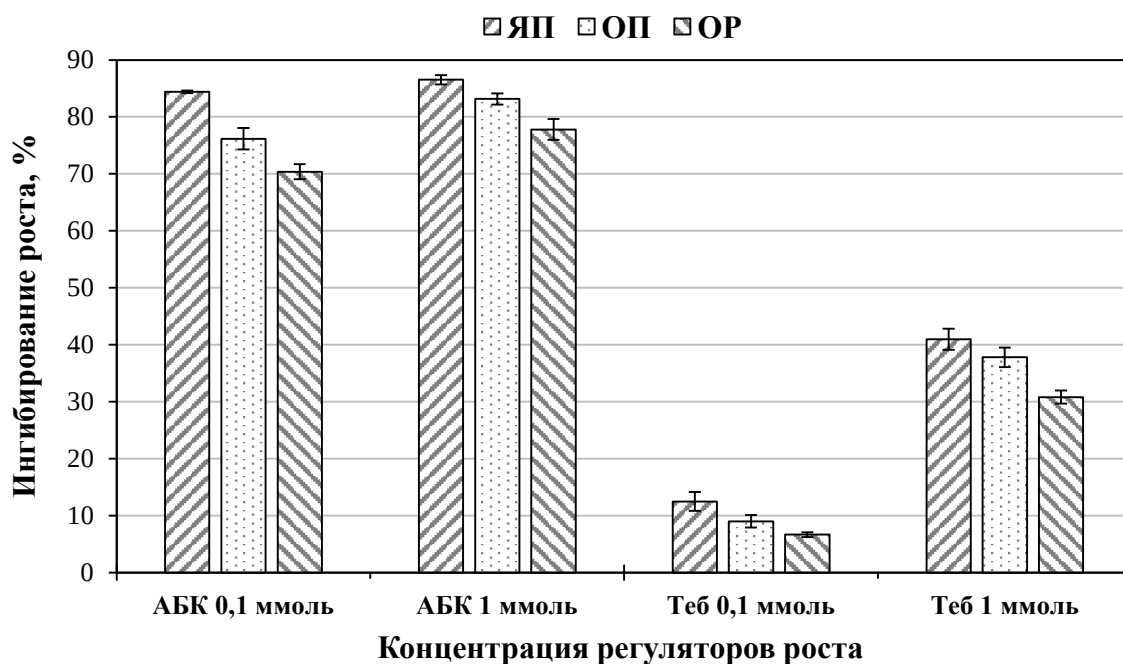


Рис. 10. Влияние абсцизовой кислоты (природного ингибитора роста) и тебуконазола (синтетического ретарданта) на рост coleoptiles побегов злаков

Примечание: $n=3$. $M \pm S.D.$ Во всех вариантах обработки отличия значимы ($P < 0,05$). Статистическую значимость отличий определяли по методу LSD Фишера.

Обозначения: ЯП – яровая пшеница; ОП – озимая пшеница; ОР – озимая рожь; АБК – абсцизовая кислота; Теб – тебуконазол.

Растворы абсцизовой кислоты вызывали очень сильное ингибирование длины coleoptiles этиолированных проростков изучаемых злаков. Наибольшее ингибирование длины coleoptiles наблюдалось у проростков яровой пшеницы, а наименьшее – у проростков озимой ржи (рис. 10). Так, у проростков яровой пшеницы концентрация АБК 0,1 мМ вызывала ингибирование длины в 6,3 раза, а 1 мМ – в 7,4 раза. У проростков озимой пшеницы обработка растворами АБК в концентрациях 0,1 мМ и 1 мМ вызывала ингибирование длины в 4,1 раза и 5,8 раза, а у озимой ржи – в 3,3 раза и 4,5 раза, соответственно. Ингибирующие эффекты АБК в концентрациях 0,1 мМ и 1 мМ на рост coleoptiles проростков изучаемых злаков статистически значимо различались.

Растворы тебуконазола также ингибировали рост проростков злаков, но в меньшей степени, чем растворы АБК. Как и в случае АБК наибольший

ингибирующий эффект наблюдался на проростках яровой пшеницы, а наименьший – на проростках озимой ржи. Обработка проростков яровой пшеницы, озимой пшеницы и озимой ржи 0,1 мМ раствором тебуконазола вызывала незначительное ингибирование их длины (рис. 10). Данные показатели ингибирования роста были статистически значимо ниже ингибирования, которое вызывалось обработкой препаратом «Бункер» в концентрации 0,5 мкл/г семян (рис. 11).

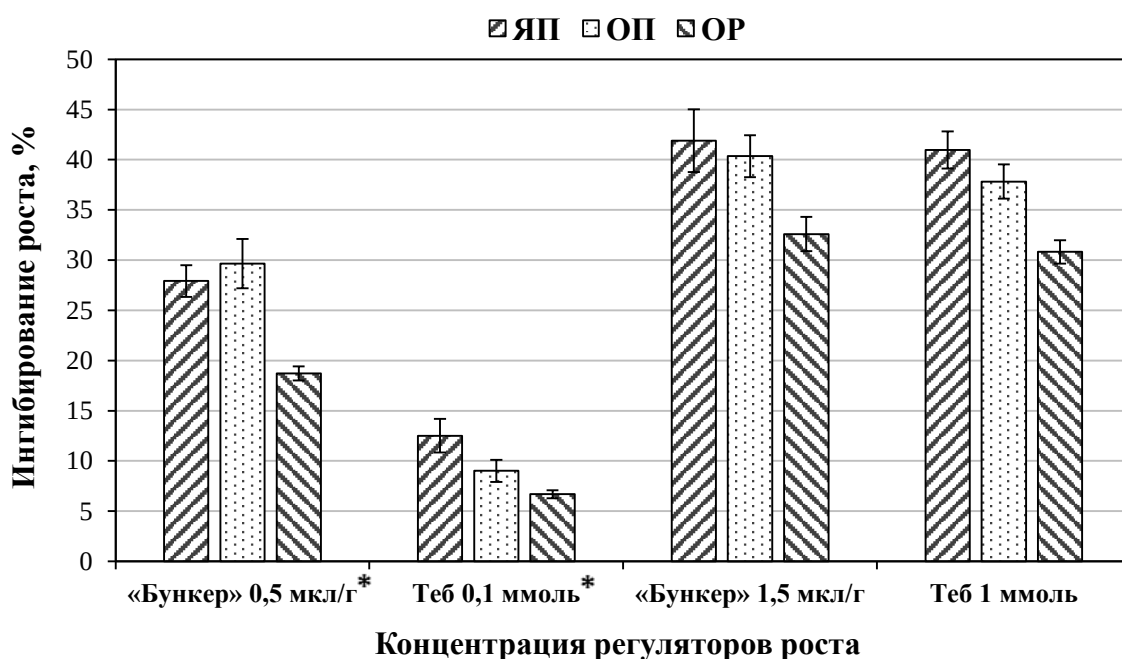


Рис. 11. Влияние тебуконазола и тебуконазол-содержащего препарата «Бункер» на рост coleoptiles побегов злаков

Примечание: $n=3-4$. $M \pm S.D.$ * – между вариантами обработок «Бункер» 0,5 мкл/г и Теб 0,1 ммоль обнаружены статистически значимые отличия ($P < 0,05$) для каждого злака. Статистическую значимость отличий определяли по методу LSD Фишера.

Обозначения: ЯП – яровая пшеница; ОП – озимая пшеница; ОР – озимая рожь; Теб – тебуконазол; «Бункер» – препарат «Бункер».

Обработка проростков яровой пшеницы, озимой пшеницы и озимой ржи 1 мМ раствором тебуконазола ингибировала рост coleoptiles проростков в 1,7, 1,6 и 1,4 раза (или на 41%, 38% и 31%), соответственно (рис. 10). Данное ингибирование длины coleoptiles статистически значимо не отличалось от ингибирования, которое оказывал протравитель «Бункер» в концентрации 1,5 мкл/г семян (рис. 11). Поскольку тебуконазол в концентрации 1 мМ вызывал ингибирование длины coleoptiles, статистически значимо не отличающееся от

ингибирования, которое вызывает препарат «Бункер» в концентрации 1,5 мкл/г семян, данная концентрация тебуконазола была выбрана для дальнейших лабораторных экспериментов. Можно предположить, что более сильное ингибирующее действие тебуконазол-содержащего протравителя по сравнению с тебуконазолом связано с наличием в промышленном водно-суспензионном концентрате «Бункер» дополнительных веществ (краситель, прилипатель, смачиватель, диспергаторы, антифриз, загуститель и др.), обеспечивающих лучшее проникновение действующего вещества протравителя в клетки.

3.1.2. Влияние препарата «Бункер» на жизнеспособность клеток coleoptилей злаков

При помощи метода восстановления 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида (ТТХ) была изучена жизнеспособность клеток coleoptилей злаков с целью определить насколько безопасно использование протравителя семян «Бункер» для растений яровой пшеницы, озимой пшеницы и озимой ржи в концентрации выше рекомендованной производителем (производитель даёт рекомендации относительно концентраций протравителя, которые используются только для достижения фунгицидного эффекта препарата). Оценку жизнеспособности проводили на пятисуточных этиолированных проростках злаков, выращенных из необработанных и обработанных препаратом «Бункер» семян при 24 °С. Для обработки семян использовали следующие концентрации препарата «Бункер»: 1,5, 3, 4 и 5 мкл/г семян. Величина восстановления ТТХ, которая наблюдалась в coleоптилях пятисуточных проростков злаков после кипячения, считалась таковым значением для «погибших» растений. Значения, характеризующие жизнеспособность клеток coleoptилей у исследуемых злаков, при всех вариантах обработок статистически значимо отличались, лишь между значениями, соответствующими концентрациям 3 и 4 мкл/г семян, не было обнаружено статистически значимых отличий (рис. 12).

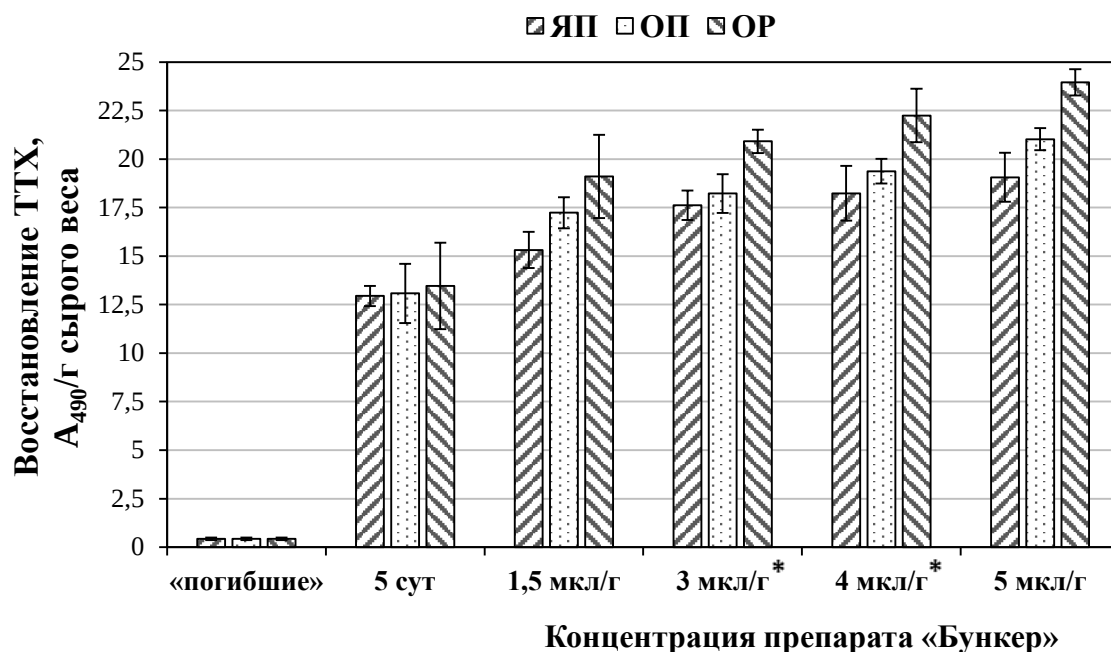


Рис. 12. Влияние препарата «Бункер» на жизнеспособность клеток coleoptилей злаков

Примечание: $n=3$. $M \pm S.D.$ * – между вариантами 3 и 4 мкл/г не обнаружено статистически значимых отличий для каждого злака, в остальных случаях отличия значимы ($P < 0,05$). Статистическую значимость отличий определяли по методу LSD Фишера.

Обозначения: ЯП – яровая пшеница; ОП – озимая пшеница; ОР – озимая рожь; «погибшие» – coleoptили пятисуточных проростков злаков после кипячения; 5 сут – coleoptили пятисуточных проростков злаков, выращенные из необработанных препаратом «Бункер» семян.

В возрасте пяти суток жизнеспособность клеток coleoptилей этиолированных проростков всех злаков была на одном уровне. У пятисуточных этиолированных проростков яровой пшеницы, озимой пшеницы и озимой ржи, выращенных из обработанных препаратом «Бункер» семян (концентрация протравителя 1,5 мкл/г – в 3 раза превышает рекомендованную), жизнеспособность клеток coleoptилей проростков была выше на 18,2%, 31,8% и 41,9%, соответственно, по сравнению с необработанными проростками. Использование большей концентрации препарата «Бункер» приводило к концентрационно-зависимому увеличению жизнеспособности клеток coleoptилей проростков злаков. Так, при обработке семян злаков препаратом «Бункер» в концентрации 3 мкл/г (в 6 раз превышающей рекомендованную) жизнеспособность клеток coleoptилей проростков яровой пшеницы, озимой пшеницы и озимой ржи увеличилась на 36,1%, 39,4% и 55,4%, в концентрации 4

мкл/г (в 8 раз превышающей рекомендованную) – на 40,8%, 48,1% и 65,3%, а в концентрации 5 мкл/г (в 10 раз превышающей рекомендованную) – на 47,2%, 60,8% и 77,9%, соответственно (рис. 12).

Таким образом, изучение жизнеспособности клеток coleoptилей показало, что обработка семян протравителем «Бункер» не приводит к гибели клеток проростков. Более того, с увеличением концентрации протравителя «Бункер» наблюдается увеличение восстановления ТТХ в клетках coleoptилей злаков, что свидетельствует о жизнеспособности большого числа клеток coleoptилей. Полученные результаты соответствуют литературным данным, характеризующим производные триазола как ретарданты, обладающие низкой фитотоксичностью (Мельников и др., 1995; Прусакова и Чижова, 1998). Можно предположить, что увеличение жизнеспособности клеток происходит благодаря ретардантным свойствам тебуконазола – ретарданты не только замедляют процессы роста, но и отодвигают сроки старения (Прусакова и Чижова, 1998; Павлова, 2003; Косулина и др., 2011). В таком случае обработка семян злаков тебуконазол-содержащим препаратом «Бункер» привела к более медленному росту и затормозила старение проростков, которые по своему физиологическому возрасту не соответствовали пятисуточным проросткам из необработанных семян. Как было показано в наших исследованиях, гибель клеток coleoptилей злаков (озимой пшеницы и кукурузы) происходит на 5-6-е и 6-8-е сутки роста проростков, соответственно (Корсукова и др., 2013а,б).

Гибель большинства клеток и тканей в многоклеточном организме генетически обусловлена, является составляющей онтогенеза, реализуясь на определённом его этапе, и носит название программируемой клеточной гибели (ПКГ). В качестве модели для изучения механизмов ПКГ у травянистых растений может выступать coleoptиль злаков, который является ювенильным органом и характеризуется краткостью периода развития и завершением физиологической функции по типу ПКГ (Ванюшин, 2001). На животных клетках показано, что митохондрии играют центральную роль в развитии ПКГ. Так, выход цитохрома с из митохондрий, при нарушении структуры их мембран,

может быть пусковым механизмом ПКГ за счёт активации каспаз (Скулачев, 2001). Существуют доказательства присутствия протеаз с каспазо-подобной активностью у растений (Chichkova et al., 2010), а также работы, показывающие высвобождение цитохрома c из митохондрий в цитоплазму при развитии ПКГ у растений (Vianello et al., 2007).

Нами было изучено изменение жизнеспособности клеток coleoptiles этиолированных проростков озимой пшеницы в естественных условиях старения (рис. 13).

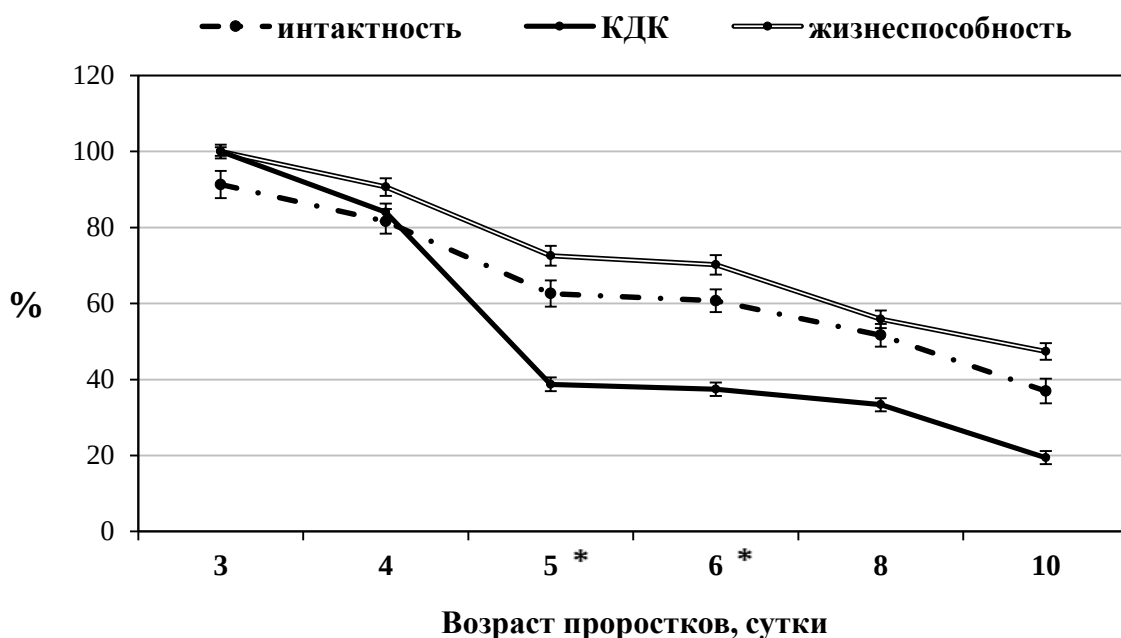


Рис. 13. Изменение жизнеспособности клеток coleoptiles этиолированных проростков озимой пшеницы разного возраста, изменение интактности и коэффициента дыхательного контроля (КДК) изолированных из них митохондрий

Примечание: $n=4$. $M \pm S.D.$ * – между значениями, соответствующими 5-м и 6-м суткам роста, не обнаружено статистически значимых отличий для показателей: «жизнеспособность», «интактность», «КДК». Статистическую значимость отличий ($P \leq 0,05$) определяли по методу LSD Фишера.

За 100% принята величина жизнеспособности клеток coleoptiles 3-х суточных проростков озимой пшеницы (определяемая по восстановлению ТТХ) и величина КДК изолированных из них митохондрий.

Оптическая плотность формазана, образовавшегося при восстановлении ТТХ в клетках coleoptiles трёхсуточных этиолированных проростков озимой

пшеницы, составляла $17,8 \pm 1,6$ и была принята за 100%. Изучение изменения жизнеспособности клеток coleoptилей с возрастом (3-10-е сутки роста проростков) показало, что на 5-6-е сутки роста проростков снижение жизнеспособности клеток coleoptилей составляет 28-30%, на 8-е сутки – 44%, на 10-е сутки – 53% (рис. 13). Значения жизнеспособности клеток coleoptилей на 5-6-е сутки роста проростков статистически не отличались, можно предположить, что у проростков озимой пшеницы этого возраста запускаются процессы гибели клеток coleoptиля.

Из клеток coleoptилей этиолированных проростков озимой пшеницы разного возраста были изолированы митохондрии и изучена интактность внешней митохондриальной мембраны и степень сопряжения процессов окисления и фосфорилирования, оцениваемая по величине коэффициента дыхательного контроля (КДК). Оказалось, что митохондрии, изолированные из coleoptилей трёхсуточных этиолированных проростков озимой пшеницы, имели высокую степень интактности наружной митохондриальной мембраны и сопряжения процессов окисления и фосфорилирования (рис. 13). КДК у этих митохондрий был равен $6,33 \pm 1,13$ и принят за 100%. По мере роста проростков и старения coleoptиля происходили изменения функциональной активности изолированных из них митохондрий. Уже на 5-е сутки роста наблюдали значительное снижение интактности митохондрий (на 38%) и КДК (на 62%), статистически не отличающиеся от изменений данных показателей, происходящих и на 6-е сутки роста. На 8-е и, особенно, на 10-е сутки роста изменения в интактности митохондрий и величине КДК становились ещё более выраженными и статистически отличались от изменений на 5-е и 6-е сутки роста. Так, снижение КДК на 10-е сутки роста проростков составило 81%, а снижение интактности – 54% (рис. 13).

Нарушение интактности митохондрий в coleoptилях этиолированных проростков озимой пшеницы на 5-10-е сутки роста сопровождалось частичным высвобождением цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму. На это указывают

результаты SDS-PAGE с последующим иммуноблоттингом с антителами против цитохрома *c* (рис. 14).

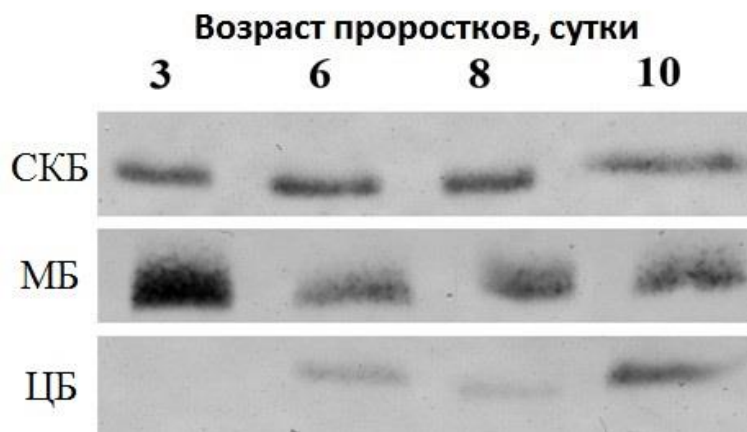


Рис. 14. Вестерн-блоттинг суммарного клеточного, митохондриального и цитоплазматического белков из клеток coleoptiles этиолированных проростков озимой пшеницы разного возраста с антителами против цитохрома *c*

Примечание: $n=3$. Представлен типичный иммуноблотт, SDS-PAGE – 15%.

Обозначения: СКБ – суммарный клеточный белок; МБ – митохондриальный белок; ЦБ – цитоплазматический белок.

Если в клетках coleoptiles трёхсуточных этиолированных проростков озимой пшеницы цитохром *c* детектировался только в белках митохондриальной фракции, то на 6-е, 8-е и 10-е сутки роста проростков содержание цитохрома *c* в митохондриальной фракции снижалось, и он обнаруживался в белках цитоплазматической фракции. Содержание цитохрома *c* в суммарной фракции белков клеток coleoptiles этиолированных проростков озимой пшеницы разного возраста не изменялось (рис. 14).

Таким образом, гибель клеток coleoptiles этиолированных проростков озимой пшеницы по типу ПКГ происходит на 5-6-е сутки роста проростков и сопровождается нарушением интактности митохондрий и снижением степени сопряжения процессов окисления и фосфорилирования митохондрий, а также выходом цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму. Вышесказанное позволяет объяснить, почему жизнеспособность клеток coleoptiles пятисуточных злаков из необработанных семян была ниже жизнеспособности клеток злаков этого же календарного возраста, выращенных из семян, обработанных тебуконазол-содержащим препаратом «Бункер» (рис. 12).

3.2. ВЛИЯНИЕ ТЕБУКОНАЗОЛ-СОДЕРЖАЩЕГО ПРОТРАВИТЕЛЯ СЕМЯН «БУНКЕР» НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ЗАКАЛИВАНИЯ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ, ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ И ОЗИМОЙ РЖИ

Низкотемпературному закаливанию подвергали трёхсуточные этиолированные проростки яровой пшеницы, озимой пшеницы и озимой ржи, выращенные при 24 °С из семян, необработанных препаратом «Бункер» (контрольные проростки), и семян, обработанных препаратом «Бункер» в концентрации 1,5 мкл/г семян. Закаливание проводили в течение семи суток в темноте при 2 °С.

Изучали влияние обработки семян исследуемых злаков препаратом «Бункер» на жирнокислотный состав, синтез дегидринов, содержание сахаров и интенсивность дыхания в тканях, выращенных из них проростков.

3.2.1. Влияние обработки семян препаратом «Бункер» на жирнокислотный состав в тканях побегов яровой пшеницы, озимой пшеницы и озимой ржи при холодовом закаливании

Клеточные мембраны очень чувствительны к отрицательному влиянию низких неблагоприятных температур. В связи с этим при гипотермии наблюдаются структурные перестройки мембран, благодаря которым минимизируется риск повреждения мембран внеклеточным льдом, увеличивается текучесть липидного бислоя мембран и снижается температура его фазового перехода из жидкокристаллического в гелеобразное состояние, увеличивается проницаемость мембран для воды, что предотвращает внутриклеточное льдообразование (Касперска-Палач, 1983; Левитт, 1983; Хочачка и Сомеро, 1988; Верещагин, 2007). Известно, что холодовое закаливание растений сопровождается изменением жирнокислотного состава мембранных липидов. В частности, происходит увеличение содержания ННЖК и ПНЖК (Касперска-Палач, 1983; Шаяхметова и др., 1990; Новицкая и др., 1990,

2000; Верещагин, 2007; Макаренко и др., 2010; Попов и др., 2012; Miller et al., 1974). Наибольшее значение при низкотемпературной адаптации злаков играет увеличение содержания α -линоленовой кислоты (Климов и др., 1993; Верещагин, 2007).

В связи с этим был изучен жирнокислотный состав побегов этиолированных проростков яровой пшеницы, озимой пшеницы и озимой ржи у контрольных растений и у растений, выращенных из семян, обработанных препаратом «Бункер», до и после низкотемпературного закаливания. Относительное содержание жирных кислот определяли в весовых процентах (вес. %) от общего их содержания. Полученные данные представлены в виде медианы (Me), а разброс значений – в виде интерквартильной широты [25%;75% процентиль], т.к. распределение большинства данных отличалось от нормального.

В таблице 1 приведён жирнокислотный состав побегов этиолированных проростков яровой пшеницы (до и после закаливания), представленный жирными кислотами, содержащими от 14 до 22 углеродных атомов. Среди НЖК в контрольных растениях до закаливания преобладали пальмитиновая (C16:0) и стеариновая (C18:0) кислоты, а среди ННЖК и ПНЖК – олеиновая (C18:1(n-9)), линолевая (C18:2(n-6)) и α -линоленовая (C18:3(n-3)) кислоты. Содержание остальных НЖК, ННЖК и ПНЖК не превышало 1% (табл. 1).

У незакалённых проростков яровой пшеницы, выращенных из семян, обработанных препаратом «Бункер», по сравнению с контрольными растениями, в основном, наблюдалось снижение содержания НЖК и увеличение содержания ННЖК и ПНЖК. В частности, статистически значимо снизилось содержание кислот пальмитиновой (C16:0) на 15,4% и стеариновой (C18:0) на 37,9%, а увеличилось – α -линоленовой (C18:3(n-3)) на 17,6%. По сравнению с контролем ИДС повысился на 10,6%, а отношение $\Sigma_{\text{ННЖК}}/\Sigma_{\text{НЖК}}$ – на 31,6%. Таким образом, обработка семян яровой пшеницы препаратом «Бункер» уже в контрольных условиях приводила к увеличению степени ненасыщенности ЖК (табл. 1).

Таблица 1

Жирнокислотный состав (вес. %) побегов этилированных проростков яровой пшеницы, выращенных из необработанных (Контроль) и обработанных препаратом «Бункер» семян

Жирная кислота	До закаливания		Холодовое закаливание	
	Контроль n=4	«Бункер» n=4	Контроль n=4	«Бункер» n=3
C14:0	0,64 [0,49;0,75]	0,50 [0,36;0,68]	0,45 [0,35;0,80]	0,38 [0,00;0,54]
C15:0	0,22 [0,04;0,37]	0,12 [0,00;0,27]	0,30 [0,07;0,35]	0,25 [0,00;0,32]
C16:0	29,19^{а,б} [26,18;31,58]	24,68^а [24,19;25,47]	25,85^б [24,94;27,18]	27,25 [25,99;27,37]
C16:1*	0,81 [0,54;1,10]	0,25 [0,00;0,51]	0,79 [0,70;0,88]	0,62 [0,35;0,81]
C17:0	0,09 [0,00;0,22]	0,00 [0,00;0,13]	0,00 [0,00;0,22]	—
C18:0	1,24^а [1,08;1,76]	0,77^а [0,51;0,88]	0,99 [0,85;1,41]	1,02 [0,95;1,37]
C18:1(n-9)	8,03 [7,17;8,97]	7,18 [6,08;7,64]	6,06 [5,37;7,62]	9,49 [7,10;9,62]
C18:1(n-7)	0,70 [0,64;0,71]	0,94 [0,79;1,07]	0,50 [0,45;0,91]	0,81 [0,81;0,85]
C18:2(n-6)	32,22 [30,72;33,59]	32,92^е [31,21;35,06]	28,61^е [26,91;29,86]	27,00 [26,81;31,53]
C18:3(n-3)	25,67^{а,б,в} [25,28;25,76]	30,19^а [29,02;34,15]	33,48^{б,д} [32,63;34,18]	31,02^{в,д} [28,47;31,94]
C20:0	0,13 ^{б,в} [0,11;0,15]	0,08 ^{г,е} [0,00;0,17]	0,32 ^{б,е} [0,23;0,48]	0,29 ^{в,г} [0,22;0,59]
C20:1(n-11)	0,66 [0,48;0,68]	0,61 [0,13;0,80]	0,51 [0,47;0,65]	0,68 [0,52;0,83]
C20:2(n-9)	0,00 [0,00;0,27]	0,14 [0,00;0,47]	0,15 [0,00;0,39]	—
C22:0	0,60 ^{б,в} [0,43;0,74]	0,82 ^{г,е} [0,63;1,24]	1,42 ^{б,е} [1,24;1,46]	1,46 ^{в,г} [1,23;1,54]
ИДС	1,51^{а,б,в} [1,48;1,57]	1,67^{а,г} [1,65;1,74]	1,67^{б,д} [1,63;1,70]	1,59^{в,г,д} [1,58;1,62]
Σнжк	32,35^а [29,39;34,27]	26,65^{а,г,е} [26,11;28,07]	30,00^е [28,59;30,28]	30,66^г [29,31;30,79]
Σннжк	67,65^а [65,73;70,61]	73,35^{а,г,е} [71,93;73,89]	70,00^е [69,72;71,41]	69,34^г [69,21;70,69]
Σннжк/Σнжк	2,09^{а,б,в} [1,92;2,21]	2,75^{а,г,е} [2,56;2,83]	2,33^{б,д,е} [2,30;2,50]	2,26^{в,г,д} [2,25;2,41]

Примечание (табл. 1): Холодовое закаливание 3-х суточных проростков злаков проводили в течение 7 суток при 2 °С. **C16:1*** – сумма изомеров пальмитолеиновой кислоты; **ИДС** – индекс двойной связи; **Σ_{НЖК}** – сумма насыщенных жирных кислот; **Σ_{ННЖК}** – сумма ненасыщенных жирных кислот; **Σ_{ННЖК}/Σ_{НЖК}** – отношение суммы ненасыщенных жирных кислот к сумме насыщенных жирных кислот. *n*=3-4. Ме [25%;75%]. Статистическую значимость отличий (*P*≤0,05) определяли, используя Н-критерий Краскела-Уоллиса. ^а – различия между вариантами контроль до закаливания и «Бункер» до закаливания статистически значимы; ^б – различия между вариантами контроль до закаливания и контроль закаливание статистически значимы; ^в – различия между вариантами контроль до закаливания и «Бункер» закаливание статистически значимы; ^г – различия между вариантами «Бункер» до закаливания и «Бункер» закаливание статистически значимы; ^д – различия между вариантами контроль закаливание и «Бункер» закаливание статистически значимы; ^е – различия между вариантами «Бункер» до закаливания и контроль закаливание статистически значимы.

По качественному разнообразию жирнокислотный состав контрольных закалённых растений яровой пшеницы соответствовал составу незакалённых растений (табл. 1). Закаливание контрольных растений сопровождалось снижением содержания НЖК и увеличением ННЖК и ПНЖК, статистически значимо увеличилось содержание α-линоленовой кислоты (C18:3(*n*-3)) на 30,4%. О качестве закаливания контрольных растений яровой пшеницы свидетельствует увеличение ИДС на 10,5% (табл. 1).

Закаливание проростков яровой пшеницы, выращенных из обработанных препаратом «Бункер» семян, приводило к снижению разнообразия жирнокислотного состава (отсутствовали C17:0 и C20:2(*n*-9)). Не наблюдалось значительного изменения в содержании НЖК и ННЖК. Отношение Σ_{ННЖК}/Σ_{НЖК} (как и показатель ИДС) превышало таковое у контрольных незакалённых проростков, но уступало контрольным закалённым проросткам и незакалённым проросткам, выращенным из семян, обработанных препаратом «Бункер» (табл. 1). В целом, закалённые растения яровой пшеницы, выращенные из обработанных препаратом «Бункер» семян, по жирнокислотному составу не отличались или даже немного уступали контрольным закалённым растениям.

В таблице 2 приведён жирнокислотный состав побегов этилированных проростков озимой пшеницы (до и после закаливания), представленный жирными кислотами, содержащими от 14 до 22 углеродных атомов. Среди НЖК

в контрольных растениях до закаливания преобладали: пальмитиновая (C16:0), стеариновая (C18:0) и бегеновая (C22:0) кислоты, а среди ННЖК и ПНЖК – олеиновая (C18:1(n-9)), линолевая (C18:2(n-6)) и α -линоленовая (C18:3(n-3)). Содержание остальных НЖК, ННЖК и ПНЖК не превышало 1% (табл. 2).

У незакалённых проростков озимой пшеницы (как и у яровой), выращенных из семян, обработанных препаратом «Бункер», по сравнению с контрольными растениями озимой пшеницы наблюдалось снижение содержания НЖК и увеличение содержания ННЖК и ПНЖК (табл. 2). Содержание α -линоленовой кислоты (C18:3(n-3)) статистически значимо увеличилось на 9,8%. По сравнению с контролем ИДС повысился на 2,5%, а отношение $\Sigma_{\text{ННЖК}}/\Sigma_{\text{НЖК}}$ – на 3%. Таким образом, обработка семян озимой пшеницы (как и яровой) препаратом «Бункер» уже в контрольных условиях приводила к увеличению степени ненасыщенности жирных кислот (табл. 2).

Закаливание контрольных растений озимой пшеницы сопровождалось достоверным увеличением содержания α -линоленовой кислоты (C18:3(n-3)) на 8,6%. По качественному разнообразию жирнокислотный состав контрольных закалённых растений озимой пшеницы практически не отличался от состава незакалённых растений (отсутствовала C20:2(n-9)) (табл. 2). Жирнокислотный состав закалённых проростков озимой пшеницы, выращенных из обработанных препаратом «Бункер» семян, качественно соответствовал жирнокислотному составу контрольных проростков и был представлен жирными кислотами, содержащими от 14 до 22 углеродных атомов. Закаливание сопровождалось снижением содержания НЖК и увеличением ННЖК и ПНЖК, о чём свидетельствует статистически значимое увеличение содержания α -линоленовой кислоты (C18:3(n-3)), ИДС и отношения $\Sigma_{\text{ННЖК}}/\Sigma_{\text{НЖК}}$. Следует отметить, что у закалённой озимой пшеницы (в отличие от яровой), выращенной из семян, обработанных препаратом «Бункер», увеличение показателей ИДС и отношения $\Sigma_{\text{ННЖК}}/\Sigma_{\text{НЖК}}$ превышало таковые у контрольных незакалённых проростков, у контрольных закалённых проростков и у незакалённых проростков, выращенных из семян, обработанных препаратом «Бункер» (табл. 2).

Таблица 2

Жирнокислотный состав (вес. %) побегов этиолированных проростков озимой пшеницы, выращенных из необработанных (Контроль) и обработанных препаратом «Бункер» семян

Жирная кислота	До закаливания		Холодовое закаливание	
	Контроль <i>n</i> =4	«Бункер» <i>n</i> =3	Контроль <i>n</i> =3	«Бункер» <i>n</i> =3
C14:0	0,63 [0,15;0,72]	0,74 [0,18;0,90]	0,50 [0,45;0,67]	0,52 [0,32;0,64]
C15:0	0,13 [0,00;0,29]	0,23 [0,05;0,32]	0,39 [0,08;0,60]	0,32 [0,23;0,33]
C16:0	27,47 [26,55;28,67]	27,02 [25,38;29,36]	28,99^д [25,21;30,75]	24,51^д [22,29;25,87]
C16:1*	0,53 [0,13;0,98]	0,31 [0,04;0,62]	0,86 [0,73;1,13]	0,77 [0,55;0,89]
C17:0	0,10 [0,00;0,22]	0,00 [0,00;0,20]	0,00 [0,00;0,18]	0,15 [0,00;0,17]
C18:0	1,00 [0,89;1,88]	0,86 [0,78;1,36]	1,47 [1,11;1,91]	1,09 [0,93;1,33]
C18:1(<i>n</i> -9)	8,24^{б,в} [7,92;8,58]	8,01^е [7,78;8,42]	6,57^{б,е} [5,54;7,47]	7,22^в [6,71;8,11]
C18:1(<i>n</i> -7)	0,92 ^в [0,75;1,05]	1,09 ^{г,е} [0,99;1,27]	0,78 [0,58;0,81]	0,62 ^{в,г,е} [0,48;0,90]
C18:2(<i>n</i> -6)	32,58 [31,01;33,31]	30,79 [30,05;32,35]	29,70 [27,46;32,33]	27,02 [25,64;28,16]
C18:3(<i>n</i> -3)	26,69^{а,б,в} [26,48;27,64]	29,33^{а,г} [26,29;30,62]	28,99^{б,д} [25,64;31,72]	35,33^{в,г,д} [29,89;37,40]
C20:0	0,13 ^б [0,03;0,14]	0,00 ^{г,е} [0,00;0,09]	0,32 ^{б,д,е} [0,30;0,40]	0,18 ^{г,д} [0,00;0,27]
C20:1(<i>n</i> -11)	0,54 [0,12;0,60]	0,52 [0,44;0,62]	0,48 [0,43;0,59]	0,51 [0,36;0,57]
C20:2(<i>n</i> -9)	0,00 ^в [0,00;0,23]	—	—	0,30 ^в [0,00;0,33]
C22:0	0,84^{б,в} [0,67;1,20]	0,90^{г,е} [0,81;1,16]	1,63^{б,е} [1,32;1,94]	1,71^{в,г} [1,53;1,91]
ИДС	1,56^{а,в} [1,55;1,57]	1,60^{а,г} [1,51;1,65]	1,53^д [1,47;1,67]	1,70^{в,г,д} [1,52;1,78]
Σ _{нжк}	30,62 [30,05;31,03]	29,93 [27,71;32,69]	33,95 [28,97;35,30]	28,32 [25,89;34,07]
Σ _{ннжк}	69,38 [68,98;69,95]	69,98 [67,31;72,24]	66,06 [64,70;71,03]	71,68 [65,93;74,12]
Σ _{ннжк} /Σ _{нжк}	2,27^{а,в} [2,22;2,33]	2,34^{а,г} [2,06;2,61]	1,95^д [1,83;2,47]	2,53^{в,г,д} [1,94;2,86]

Примечание (табл. 2): Холодовое закаливание 3-х суточных проростков злаков проводили в течение 7 суток при 2 °С. **C16:1*** – сумма изомеров пальмитолеиновой кислоты; **ИДС** – индекс двойной связи; **Σ_{нжк}** – сумма насыщенных жирных кислот; **Σ_{ннжк}** – сумма ненасыщенных жирных кислот; **Σ_{ннжк}/Σ_{нжк}** – отношение суммы ненасыщенных жирных кислот к сумме насыщенных жирных кислот. *n*=3-4. Ме [25%;75%]. Статистическую значимость отличий (*P*≤0,05) определяли, используя Н-критерий Краскела-Уоллиса. ^а – различия между вариантами контроль до закаливания и «Бункер» до закаливания статистически значимы; ^б – различия между вариантами контроль до закаливания и контроль закаливание статистически значимы; ^в – различия между вариантами контроль до закаливания и «Бункер» закаливание статистически значимы; ^г – различия между вариантами «Бункер» до закаливания и «Бункер» закаливание статистически значимы; ^д – различия между вариантами контроль закаливание и «Бункер» закаливание статистически значимы; ^е – различия между вариантами «Бункер» до закаливания и контроль закаливание статистически значимы.

Таким образом, обработка семян озимой пшеницы препаратом «Бункер» приводит к увеличению содержания ПНЖК в побегах, выращенных из них проростков, как в незакалённом состоянии, так и после закаливания. Следует отметить, что в литературе имеются данные об увеличении содержания ПНЖК в растениях, выращенных из семян, обработанных регуляторами роста (Жигачёва и др., 2011).

В таблице 3 приведён жирнокислотный состав побегов этиолированных проростков озимой ржи (до и после закаливания), представленный жирными кислотами, содержащими от 14 до 22 углеродных атомов (табл. 3). Среди НЖК в контрольных растениях до закаливания преобладали пальмитиновая (C16:0), стеариновая (C18:0) и бегеновая (C22:0) кислоты, а среди ННЖК и ПНЖК – олеиновая (C18:1(*n*-9)), *цис*-вакценовая (C18:1(*n*-7)), линолевая (C18:2(*n*-6)) и α-линоленовая (C18:3(*n*-3)) кислоты. Содержание остальных НЖК, ННЖК и ПНЖК не превышало 1% (табл. 3).

У незакалённых проростков озимой ржи, выращенных из семян, обработанных препаратом «Бункер», по сравнению с контрольными растениями озимой ржи наблюдалось статистически значимое увеличение содержания олеиновой кислоты (C18:1(*n*-9)) и отношения $\Sigma_{\text{ннжк}}/\Sigma_{\text{нжк}}$. Таким образом, обработка семян озимой ржи препаратом «Бункер» в контрольных условиях приводит к увеличению содержания ННЖК (табл. 3).

Таблица 3

Жирнокислотный состав (вес. %) побегов этиолированных проростков озимой ржи, выращенных из необработанных (Контроль) и обработанных препаратом «Бункер» семян

Жирная кислота	До закаливания		Холодовое закаливание	
	Контроль <i>n</i> =3	«Бункер» <i>n</i> =4	Контроль <i>n</i> =3	«Бункер» <i>n</i> =3
C14:0	0,65 [0,61;0,87]	0,84 [0,69;1,17]	0,51 [0,43;0,63]	0,66 [0,47;0,91]
C15:0	0,20 [0,05;0,33]	0,22 [0,05;0,26]	0,21 [0,05;0,24]	0,18 [0,04;0,24]
C16:0	27,07^{б,в} [25,78;28,45]	27,11^{г,е} [25,58;27,64]	23,78^{б,е} [23,39;25,02]	23,42^{в,г} [21,70;26,06]
C16:1*	0,56 [0,08;1,01]	0,90 [0,15;1,34]	0,58 [0,10;0,95]	0,73 [0,37;0,79]
C17:0	0,00 [0,00;0,13]	—	0,00 [0,00;0,12]	0,00 [0,00;0,08]
C18:0	1,03 [0,98;2,26]	1,03 [0,71;1,17]	1,37 [1,07;2,60]	1,06 [0,89;1,33]
C18:1(<i>n</i> -9)	7,37^а [6,72;8,12]	8,14^а [7,25;8,53]	6,44 [5,95;10,80]	7,56 [6,63;9,31]
C18:1(<i>n</i> -7)	0,87 [0,80;1,12]	1,08 [0,97;1,35]	1,03 [0,77;1,13]	1,17 [0,94;1,51]
C18:2(<i>n</i> -6)	30,45 [29,66;31,34]	29,48 [28,51;30,24]	29,47^д [28,81;29,93]	26,44^д [24,09;28,80]
C18:3(<i>n</i> -3)	30,60^{б,в} [27,56;31,64]	29,79^{г,е} [28,72;33,36]	35,35^{б,д,е} [30,21;35,62]	37,11^{в,г,д} [34,44;37,81]
C20:0	0,08 [0,00;0,22]	0,10 [0,00;0,25]	0,31 [0,25;0,64]	0,23 [0,19;0,27]
C20:1(<i>n</i> -11)	0,48 [0,11;0,74]	0,59 [0,14;0,66]	0,47 [0,41;0,56]	0,45 [0,43;0,55]
C20:2(<i>n</i> -9)	0,00 [0,00;0,22]	—	—	0,00 [0,00;0,21]
C22:0	0,64 [0,12;1,12]	0,70 [0,15;1,13]	1,23 [1,00;1,62]	1,08 [0,74;1,13]
ИДС	1,62^{б,в} [1,55;1,66]	1,61^{г,е} [1,57;1,67]	1,74^{б,д,е} [1,54;1,75]	1,76^{в,г,д} [1,65;1,79]
Σ _{нжк}	30,11^{б,в} [28,64;31,82]	29,63^{г,е} [28,26;30,91]	27,19^{б,е} [26,61;30,64]	26,47^{в,г} [24,92;29,29]
Σ _{ннжк}	69,89^{б,в} [68,18;71,36]	70,37^{г,е} [69,09;71,75]	72,81^{б,е} [69,36;73,39]	73,53^{в,г} [70,71;75,08]
Σ _{ннжк} /Σ _{нжк}	2,33^{а,б,в} [2,14;2,49]	2,38^{а,г,е} [2,24;2,54]	2,68^{б,д,е} [2,27;2,76]	2,79^{в,г,д} [2,42;2,99]

Примечание (табл. 3): Холодовое закаливание 3-х суточных проростков злаков проводили в течение 7 суток при 2 °С. **C16:1*** – сумма изомеров пальмитолеиновой кислоты; **ИДС** – индекс двойной связи; **Σ_{нжк}** – сумма насыщенных жирных кислот; **Σ_{ннжк}** – сумма ненасыщенных жирных кислот; **Σ_{ннжк}/Σ_{нжк}** – отношение суммы ненасыщенных жирных кислот к сумме насыщенных жирных кислот. *n*=3-4. Ме [25%;75%]. Статистическую значимость отличий ($P \leq 0,05$) определяли, используя Н-критерий Краскела-Уоллиса. ^а – различия между вариантами контроль до закаливания и «Бункер» до закаливания статистически значимы; ^б – различия между вариантами контроль до закаливания и контроль закаливание статистически значимы; ^в – различия между вариантами контроль до закаливания и «Бункер» закаливание статистически значимы; ^г – различия между вариантами «Бункер» до закаливания и «Бункер» закаливание статистически значимы; ^д – различия между вариантами контроль закаливание и «Бункер» закаливание статистически значимы; ^е – различия между вариантами «Бункер» до закаливания и контроль закаливание статистически значимы.

Закаливание контрольных растений озимой ржи сопровождалось снижением содержания НЖК и увеличением ННЖК и ПНЖК, о чём свидетельствует статистически значимое увеличение ИДС на 7% и отношения $\Sigma_{\text{ннжк}}/\Sigma_{\text{нжк}}$ на 15%. Содержание α-линоленовой кислоты (C18:3(n-3)) у контрольных закалённых растений увеличилось на 15,5%. По качественному разнообразию жирнокислотный состав контрольных закалённых растений озимой ржи практически не отличался от состава незакалённых растений (отсутствовала C20:2(n-9)) (табл. 3).

Жирнокислотный состав закалённых проростков озимой ржи, выращенных из обработанных препаратом «Бункер» семян, представлен жирными кислотами, содержащими от 14 до 22 углеродных атомов. Закаливание сопровождалось снижением содержания НЖК и увеличением ННЖК и ПНЖК, о чём свидетельствует статистически значимое увеличение ИДС и отношения $\Sigma_{\text{ннжк}}/\Sigma_{\text{нжк}}$, которые превышают аналогичные показатели у контрольных незакалённых проростков, у контрольных закалённых проростков и у незакалённых проростков, выращенных из семян, обработанных препаратом «Бункер» (табл. 3). Таким образом, обработка семян озимой ржи препаратом «Бункер» приводит к увеличению содержания ПНЖК в побегах, выращенных из них проростков, при закаливании.

Жирнокислотный анализ показал, что обработка семян злаков протравителем «Бункер» приводит к увеличению содержания ННЖК в побегах,

выращенных из них проростков, что выражается в увеличении отношения $\Sigma_{\text{ННЖК}}/\Sigma_{\text{НЖК}}$. У всех злаков, выращенных из обработанных препаратом «Бункер» семян, отмечается увеличение отношения $\Sigma_{\text{ННЖК}}/\Sigma_{\text{НЖК}}$ уже в контрольных условиях. У закалённых растений озимой пшеницы и озимой ржи, выращенных из обработанных препаратом «Бункер» семян, увеличение отношения $\Sigma_{\text{ННЖК}}/\Sigma_{\text{НЖК}}$ превышает таковое у закалённых контрольных растений. Таким образом, обработка семян злаков протравителем «Бункер» приводит к повышению ненасыщенности ЖК, которое, главным образом, связано со снижением содержания насыщенной пальмитиновой кислоты и увеличением ненасыщенной α -линоленовой кислоты и особенно выражено у озимых злаков в условиях холодого закаливания. Как известно, чем больше двойных связей в жирнокислотных хвостах липидов, тем ниже температура фазового перехода и выше способность мембран нормально функционировать в области пониженных температур (Левитт, 1983; Хочачка и Сомеро, 1988; Верещагин, 2007), поэтому изменения, вызванные обработкой семян злаков тебуконазол-содержащим препаратом «Бункер», важны для повышения устойчивости растений к действию неблагоприятных низких температур.

В литературе имеются данные об АБК-индуцируемой десатурации НЖК мембранных липидов. Так, на растениях нута было показано, что обработка листьев экзогенной АБК приводила к увеличению степени ненасыщенности жирных кислот мембранных липидов, которая выражалась в повышении ИДС и увеличении содержания α -линоленовой кислоты (Bakht et al., 2006). Последующее низкотемпературное закаливание растений, обработанных АБК, приводило к ещё большему увеличению ненасыщенности жирных кислот, при этом наблюдалось усиление ацил-липидной десатурации. Принимая во внимание то, что производные триазола приводят к увеличению содержания эндогенной АБК (Павлова и др., 1995; Прусакова и Чижова, 1998; Павлова, 2003; Чижова и др., 2005), можно предположить, что увеличение степени ненасыщенности жирных кислот у злаков из обработанных тебуконазол-содержащим препаратом «Бункер» семян (как до, так и после закаливания) является АБК-зависимым.

3.2.2. Влияние обработки семян препаратом «Бункер» на синтез дегидринов в тканях яровой пшеницы, озимой пшеницы и озимой ржи при холодовом закаливании

Дегидрины – высокогидрофильные термостабильные белки с молекулярной массой от 9 до 200 кДа, гены которых экспрессируются в ответ на стрессы различной природы, в том числе в ответ на низкотемпературное воздействие. Также показано, что синтез дегидринов может индуцироваться АБК (Аллагулова и др., 2003; Thomashow, 1999; Rorat, 2006; Hanin et al., 2011). Отмечается сезонная зависимость накопления дегидринов, так, содержание дегидринов, связанных с развитием морозоустойчивости древесных и травянистых растений, приходится на зимний период (Бубякина и др., 2011; Поморцев, 2013; Татарина и др., 2013).

Дегидрины проявляют криопротекторную, антифризную активность, предотвращают дегградацию и коагуляцию макромолекул клеточных структур при обезвоживании внеклеточным льдом и снижают риск внутриклеточного льдообразования, уменьшая количество воды в клетках (Пономарев и др., 2014; Skriver and Mundy, 1990; Guy et al., 1992; Close, 1997; Goyal et al., 2005; Rorat, 2006; Hara, 2010; Hanin et al., 2011).

Учитывая столь важную роль дегидринов в условиях гипотермии, низкотемпературной адаптации, а также при раззакаливании (Kalberer et al., 2006) было изучено содержание дегидринов в тканях побегов этиолированных проростков яровой пшеницы, озимой пшеницы и озимой ржи у контрольных растений (из необработанных семян) и у растений, выращенных из семян, обработанных тебуконазол-содержащим препаратом «Бункер» в концентрации 1,5 мкл/г семян, до закаливания, в закалённом состоянии и после раззакаливания.

Иммуноблоттинг для детекции дегидринов проводили, используя поликлональные антитела (ADI-PLA-100, “StressGen”, США) против синтетического пептида, содержащего последовательность KIKEKLPG, являющуюся частью уникального К-сегмента дегидринов.

На рисунке 15 представлен типичный иммуноблотт водорастворимой фракции суммарного клеточного белка из побегов этиолированных проростков яровой пшеницы контрольных растений и растений, выращенных из семян, обработанных тебуконазол-содержащим протравителем «Бункер».

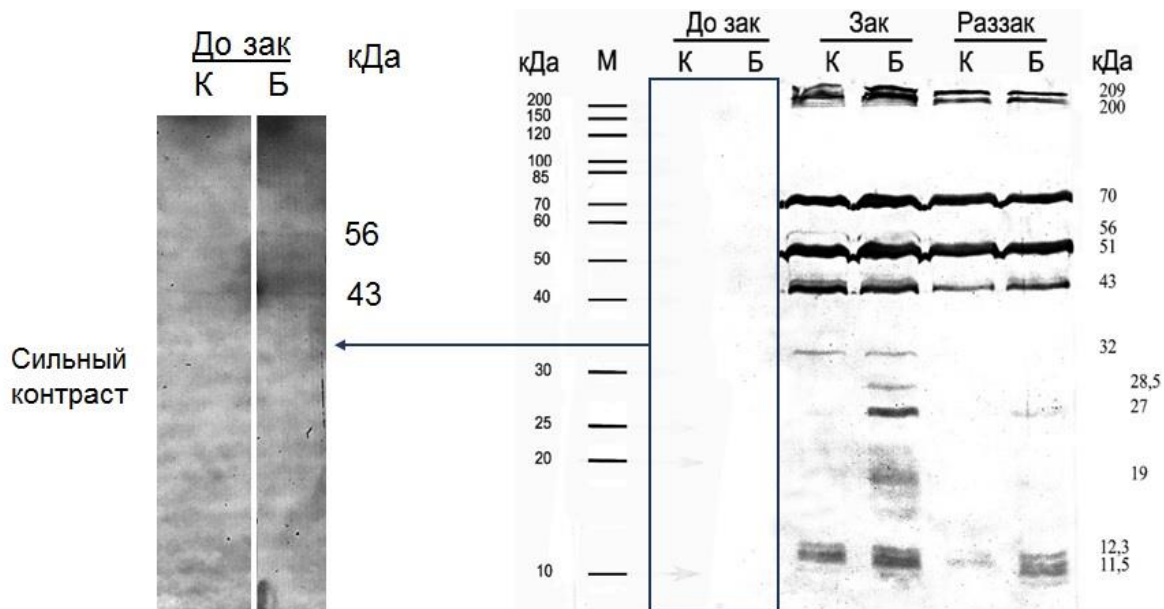


Рис. 15. Содержание дегидринов в тканях побегов этиолированных проростков яровой пшеницы из семян, необработанных и обработанных препаратом «Бункер»

Примечание: $n=3$. Представлен типичный иммуноблотт с антителами против дегидринов, SDS-PAGE – 12,5%.

Обозначения: М – белковые маркеры (“Thermo Scientific”, Литва); кДа – мол. масса маркеров (слева) и мол. масса дегидринов (справа); К – проростки из необработанных семян (контрольные проростки); Б – проростки из семян, обработанных препаратом «Бункер»; До зак – проростки «до закаливания» (24 °С, 3 суток); Зак – закалённые проростки (2 °С, 7 суток); Раззак – раззакалённые проростки (4 °С, 12 часов).

В побегах контрольных проростков яровой пшеницы после холодового закаливания присутствовали дегидрины с молекулярными массами: 209, 200, 70, 56, 51, 43, 32, 12,3 и 11,5 кДа. Обработка семян протравителем «Бункер» индуцировала появление при закаливании выращенных из них проростков трёх полипептидов с молекулярными массами: 28,5, 27 и 19 кДа (рис. 15). Дегидрин с молекулярной массой 27 кДа индуцировался значительно больше других (Корсукова и др., 2015). Раззакаливание контрольных проростков яровой пшеницы сопровождалось снижением содержания дегидринов с молекулярными массами от 43 кДа, в то время как в проростках из обработанных семян продолжал

детектироваться полипептид с молекулярной массой 27 кДа (Korsukova et al., 2015).

Спектр дегидринов из побегов проростков озимой пшеницы несколько отличался от такового у яровой пшеницы и характеризовался большим разнообразием. На рисунке 16 представлены дегидрины, детектируемые в водорастворимой фракции суммарного клеточного белка из побегов этиолированных проростков озимой пшеницы контрольных растений и растений, выращенных из семян, обработанных препаратом «Бункер».

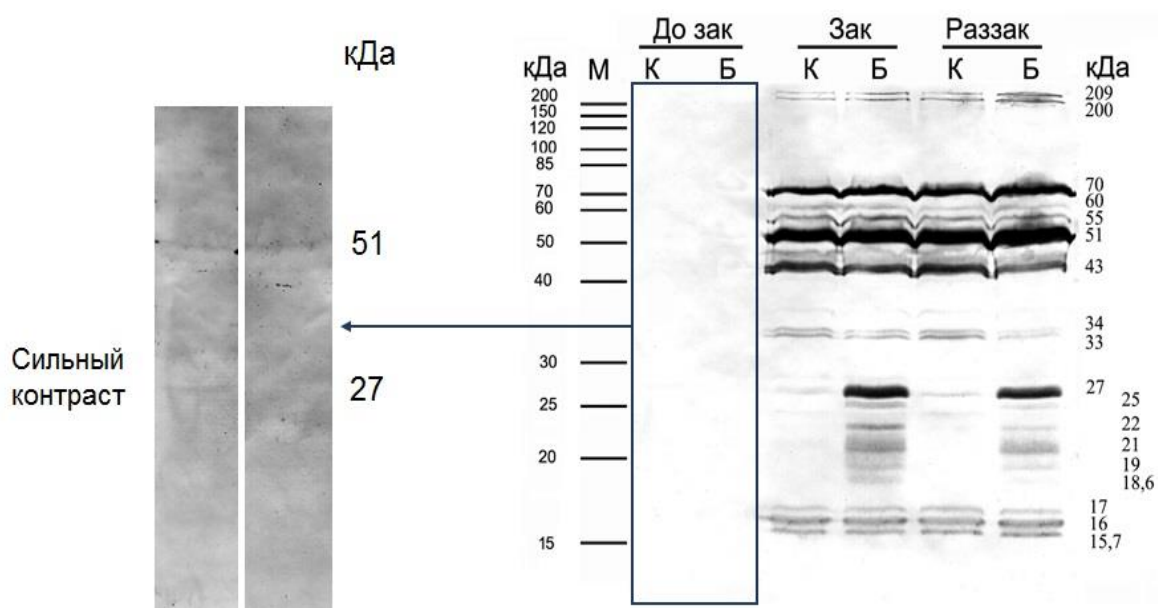


Рис. 16. Содержание дегидринов в тканях побегов этиолированных проростков озимой пшеницы из семян, необработанных и обработанных препаратом «Бункер»

Примечание: $n=3$. Представлен типичный иммуноблотт с антителами против дегидринов, SDS-PAGE – 12,5%.

Обозначения: как на рис. 15.

В побегах контрольных проростков озимой пшеницы после закаливания детектировались дегидрины с молекулярными массами: 209, 200, 70, 60, 55, 51, 43, 34, 33, 27, 17, 16 и 15,7 кДа. В побегах проростков из семян, обработанных протравителем «Бункер», при закаливании наблюдали значительную индукцию синтеза полипептида с молекулярной массой 27 кДа и появление новых полипептидов с молекулярными массами 25, 22, 21, 19 и 18,6 кДа. Дегидрин с молекулярной массой 27 кДа, как и в случае с проростками яровой пшеницы, индуцировался значительно сильнее других (рис. 16). После раззакаливания проростков,

выращенных из обработанных препаратом «Бункер» семян, содержание дегидринов с молекулярными массами 27, 25, 22, 21 и 19 кДа снижалось (Korsukova et al., 2015).

Набор полипептидов, детектируемых антителами против дегидринов, в побегах этиолированных проростков озимой ржи значительно отличался от спектра дегидринов яровой и озимой пшеницы (рис. 17).

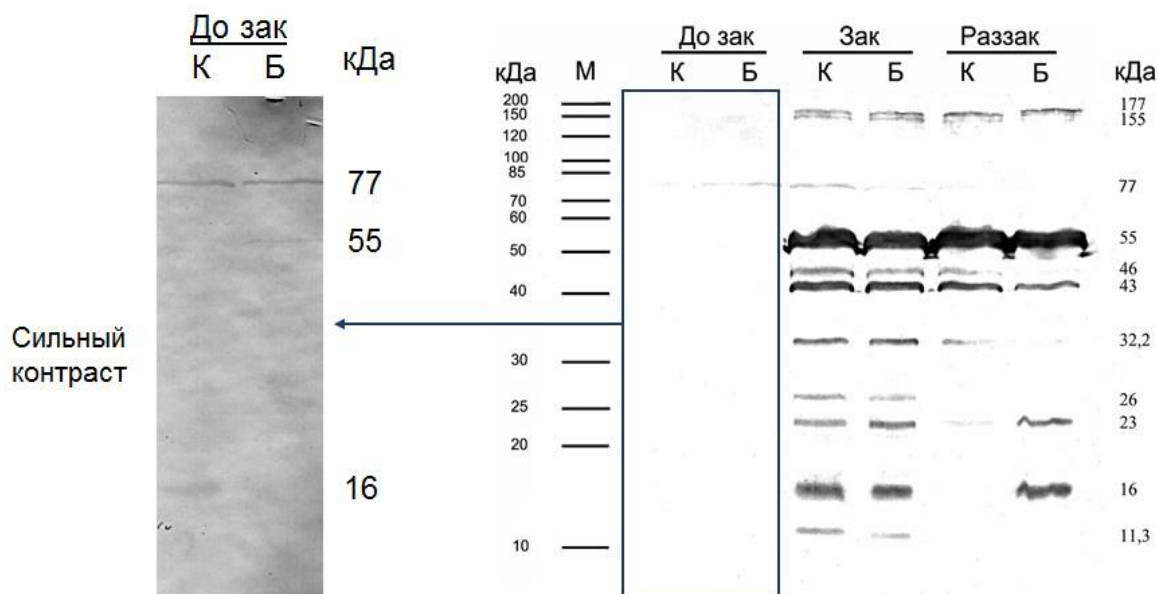


Рис. 17. Содержание дегидринов в тканях побегов этиолированных проростков озимой ржи из семян, необработанных и обработанных препаратом «Бункер»

Примечание: $n=3$. Представлен типичный иммуноблотт с антителами против дегидринов, SDS-PAGE – 12,5%.

Обозначения: как на рис. 15.

Так, в тканях побегов контрольных проростков озимой ржи после закаливания обнаруживались дегидрины с молекулярными массами: 177, 155, 77, 55, 46, 43, 32,2, 26, 23, 16, 11,3 кДа. Закаливание проростков озимой ржи, выращенных из семян, обработанных протравителем «Бункер», не сопровождалось индукцией новых полипептидов, тем не менее, после раззакаливания проростков, выращенных из обработанных препаратом «Бункер» семян, продолжали детектироваться дегидрины с молекулярными массами 23 и 16 кДа, в то время как в контрольных проростках они не обнаруживались (рис. 17).

Таким образом, обработка семян яровой и озимой пшеницы тебуконазол-содержащим препаратом «Бункер» приводит в процессе низкотемпературного закаливания проростков к индукции синтеза полипептидов, относящихся к дегидринам, поскольку при иммуноблоттинге они детектируются поликлональными антителами против К-сегмента дегидринов. Индуцированные протравителем дегидрины имеют молекулярные массы от 18,6 до 28,5 кДа, причём при закаливании дегидрины с молекулярными массами 19 и 27 кДа обнаруживаются как у яровой, так и у озимой пшеницы. Значительнее других происходит индукция синтеза дегидрина с молекулярной массой 27 кДа, который продолжает присутствовать в спектре дегидринов яровой и озимой пшеницы и после раззакаливания, хотя его содержание значительно снижается. Обработка семян озимой ржи препаратом «Бункер» при последующем низкотемпературном закаливании проростков не приводит к индукции синтеза новых полипептидов. Однако после раззакаливания этих проростков продолжают детектироваться дегидрины с молекулярными массами 23 и 16 кДа, индуцируемые низкотемпературным закаливанием.

Можно предположить, что индуцируемые обработкой тебуконазол-содержащим препаратом «Бункер» низкомолекулярные дегидрины (особенно с молекулярной массой 27 кДа) отвечают за формирование устойчивости озимой и яровой пшеницы к низким неблагоприятным температурам. Об этом также свидетельствует тот факт, что содержание этих дегидринов было выше у более морозоустойчивой озимой пшеницы. Синтез индуцируемых обработкой дегидринов, вероятно, является АБК-зависимым, поскольку, известно о способности производных триазола увеличивать содержание абсцизовой кислоты у растений (Павлова и др., 1995; Прусакова и Чижова, 1998; Павлова, 2003; Чижова и др., 2005). Также известно о положительной связи между повышением содержания водорастворимых углеводов и синтезом низкомолекулярных дегидринов у озимой пшеницы (Боровик, 2015). Возможно, что тебуконазол-зависимая индукция синтеза низкомолекулярных дегидринов также связана с изменением углеводного статуса в тканях злаков.

3.2.3. Влияние обработки семян препаратом «Бункер» на содержание сахаров в тканях яровой пшеницы, озимой пшеницы и озимой ржи при холодовом закаливании и раззакаливании

Клетки озимых травянистых растений в зимний период подвергаются угрозе обезвоживания внеклеточным льдом, во избежание этого в процессе низкотемпературной акклимации растения накапливают большое количество водорастворимых углеводов. Так, в первую фазу закаливания количество сахаров у озимых растений возрастает до 22% на сырую массу или до 40-60% на сухую массу (Кошкин, 2010; Косулина и др., 2011). Имеются сведения, что АБК влияет на метаболизм водорастворимых углеводов и активность ферментов, участвующих в их накоплении при закаливании (Kerepesi et al., 2004; Liu et al., 2013). Сахара играют полифункциональную роль в клетках растений при низкотемпературном закаливании, обладая осморегуляторными, антифризными, криопротекторными, антиоксидантными свойствами, помимо этого водорастворимые углеводы являются основными субстратами дыхания (Головко, 1999; Трунова, 2007; Косулина и др., 2011; Crowe et al., 1988; Goldstein and Nobel, 1991; Williams, 1992; Deryabin et al., 2004; Iordachescu and Imai, 2008).

Принимая во внимание столь разнообразные функции, осуществляемые водорастворимыми углеводами при низкотемпературной адаптации, было изучено изменение содержания сахаров в тканях побегов этиолированных проростков яровой пшеницы, озимой пшеницы и озимой ржи контрольных растений и растений, выращенных из семян, обработанных препаратом «Бункер» в концентрации 1,5 мкл/г семян, до закаливания, в закалённом состоянии, после раззакаливания и после промораживания раззакалённых проростков.

Схема проведения эксперимента: эксперимент проводили на базе ЦКП СИФИБР СО РАН «Фитотрон», используя камеру тепла/холода МКТ-240 («Binder», Германия). Содержание сахаров в побегах этиолированных проростков злаков, выращенных из семян необработанных (К) и обработанных препаратом «Бункер» (Б) в концентрации 1,5 мкл/г семян, определяли у 3-х и 10-

ти суточных проростков (выращенных при 24 °С), а также в холодозакалённых проростках после семи суток закаливания при 2 °С. Затем закалённые проростки промораживали (понижая температуру до –10 °С со скоростью 1 °С/ч один раз в сутки) и раззакаливали (повышая температуру до 4 °С). Определяли содержание сахаров в раззакалённых проростках (4 °С, 12 часов). После чего раззакалённые проростки подвергали промораживанию (–6 °С, 24 часа) и определяли в них содержание сахаров.

На рисунке 18 показано изменение содержания сахаров в побегах этиолированных проростков яровой пшеницы, анализируемое по вышеописанной схеме.

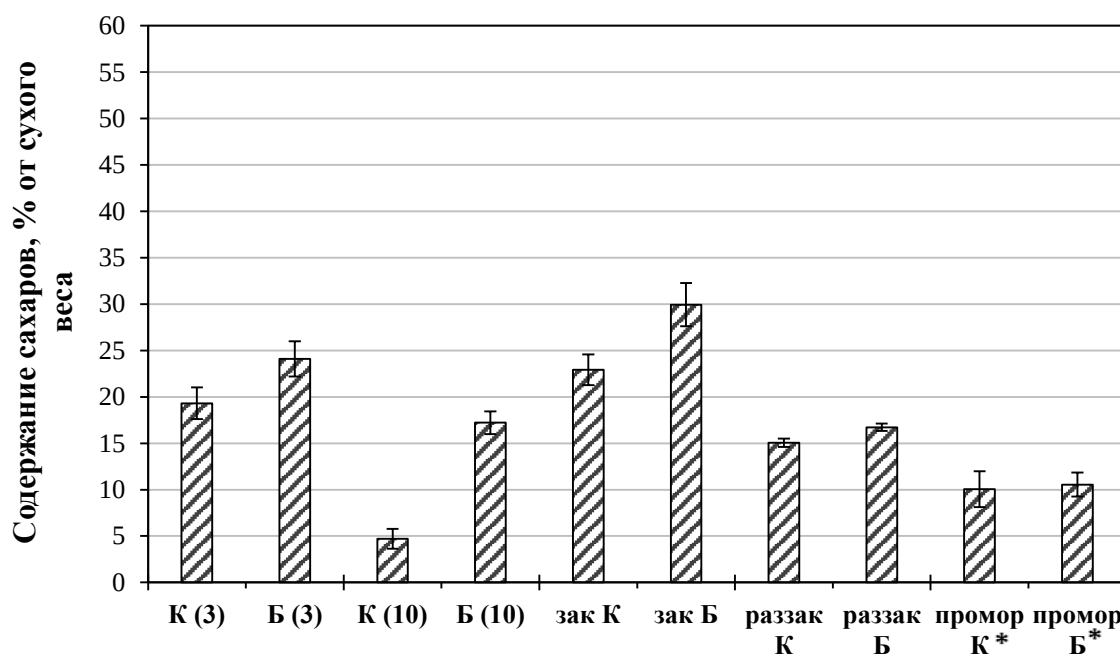


Рис. 18. Влияние препарата «Бункер» на изменение содержания сахаров в этиолированных проростках яровой пшеницы

Примечание: $n=3$. $M \pm S.D.$ * – между вариантом промор К и вариантом промор Б не обнаружены статистически значимые отличия. Во всех остальных вариантах отличия значимы ($P < 0,05$). Статистическую значимость отличий определяли по методу LSD Фишера.

Обозначения: К – проростки, выращенные из семян, необработанных препаратом «Бункер» (контрольные проростки); Б – проростки, выращенные из семян, обработанных препаратом «Бункер»; (3) и (10) – возраст проростков в сутках (при 24 °С); зак – закалённые при 2 °С проростки (в течение 7 суток); раззак – раззакалённые при 4 °С проростки (в течение 12 часов); промор – промороженные при –6 °С раззакалённые проростки (в течение 24 часов).

Обработка семян яровой пшеницы препаратом «Бункер» приводила к увеличению содержания водорастворимых углеводов в побегах, выращенных из

них проростков, по сравнению с содержанием сахаров в побегах проростков, выращенных из семян, необработанных препаратом «Бункер» (контроль). Так, по сравнению с контрольными проростками содержание водорастворимых углеводов у проростков, выращенных из обработанных препаратом «Бункер» семян, на 3-и и 10-е сутки роста было больше в 1,2 и 3,6 раза, соответственно. При холодовом закаливании в проростках, выращенных из обработанных семян, содержание сахаров по сравнению с холодозакалённым контролем было больше в 1,3 раза. После промораживания холодозакалённых растений с последующим их раззакаливанием при 4 °C произошло снижение содержания сахаров. Тем не менее, в проростках, выращенных из обработанных препаратом «Бункер» семян, по сравнению с контрольными проростками содержание сахаров было в 1,1 раза больше. Данное содержание сахаров соответствовало содержанию сахаров в 10-ти суточных незакалённых проростках, выращенных из обработанных препаратом «Бункер» семян. После промораживания раззакалённых проростков (при –6 °C в течение 24 часов) содержание сахаров в контрольных проростках и в проростках, выращенных из обработанных препаратом «Бункер» семян, снизилось примерно до одного уровня – не наблюдалось статистически значимых отличий (рис. 18).

Таким образом, обработка семян яровой пшеницы препаратом «Бункер» приводит к увеличению содержания сахаров в побегах проростков как в незакалённом состоянии, так и при закаливании. Препарат «Бункер» способствует более медленному расходованию сахаров, о чём свидетельствует большее их содержание в 10-ти суточных проростках из обработанных семян по сравнению с 10-ти суточным контролем. После промораживания закалённых проростков с последующим их раззакаливанием наблюдается снижение содержания сахаров в обоих вариантах, но в проростках из обработанных препаратом «Бункер» семян сахаров остаётся больше, и они находятся примерно на уровне 10-ти суточных проростков, выращенных из обработанных семян. После промораживания раззакалённых проростков содержание сахаров снижается в обоих вариантах примерно до одного уровня.

На рисунке 19 представлено изменение содержания сахаров в побегах этиолированных проростков озимой пшеницы, анализируемое по вышеописанной схеме.

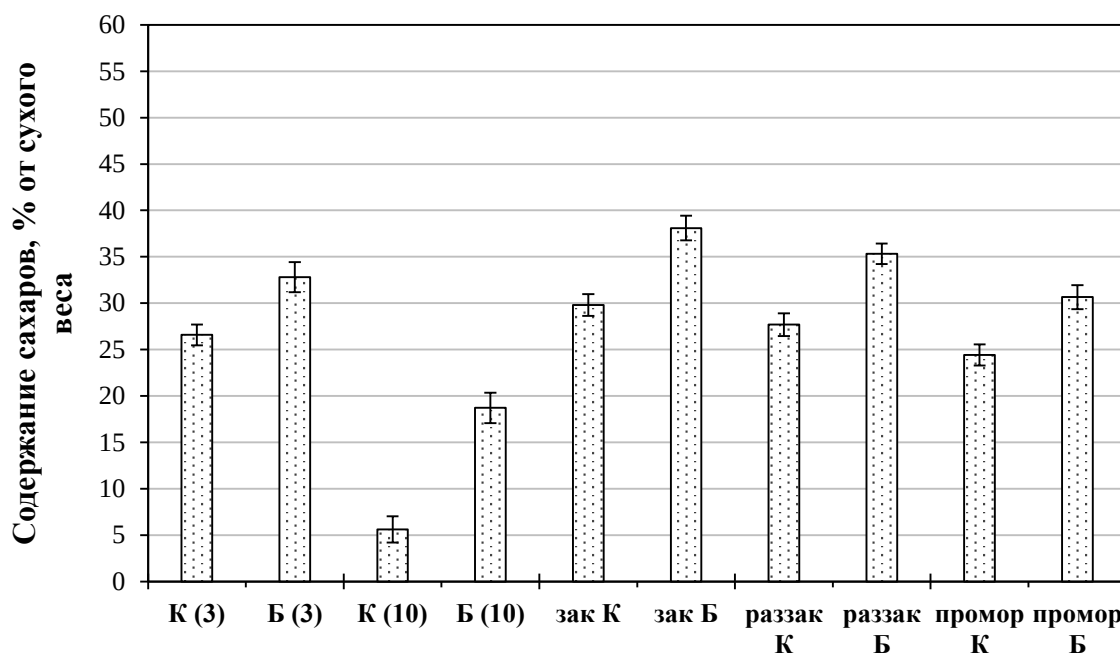


Рис. 19. Влияние препарата «Бункер» на изменение содержания сахаров в этиолированных проростках озимой пшеницы

Примечание: $n=3$. $M \pm S.D.$ Во всех вариантах отличия значимы ($P < 0,05$). Статистическую значимость отличий определяли по методу LSD Фишера.

Обозначения: как на рис. 18.

Обработка семян озимой пшеницы препаратом «Бункер» приводила к статистически значимому по сравнению с контролем увеличению содержания водорастворимых углеводов в побегах, выращенных из них проростков, на 3-и сутки роста проростков в 1,2 раза, а на 10-е сутки – в 3,3 раза. При холодовом закаливании в проростках, выращенных из обработанных семян, содержание сахаров по сравнению с холодозакалённым контролем было больше в 1,3 раза. После промораживания холодозакалённых растений с последующим их раззакаливанием при 4 °C наблюдалось снижение содержания сахаров в обоих вариантах примерно до уровня трёхсуточных проростков. При этом в проростках, выращенных из обработанных семян, по сравнению с контрольными проростками содержание сахаров было в 1,3 раза больше. После промораживания раззакалённых проростков (при –6 °C в течение 24 часов)

содержание сахаров в контрольных проростках и в проростках, выращенных из обработанных препаратом «Бункер» семян, снижалось немного ниже уровня трёхсуточных проростков. В этом случае также наблюдалось большее содержание сахаров (в 1,2 раза) в проростках из обработанных семян по сравнению с контрольными промороженными растениями (рис. 19).

Таким образом, обработка семян озимой пшеницы тебуконазол-содержащим препаратом «Бункер», как и в случае обработки семян яровой пшеницы, приводит к увеличению содержания сахаров в побегах проростков в незакалённом и закалённом состоянии. В процессе роста проростков (до 10-ти суточного возраста) наблюдается меньшее расходование сахаров проростками, выращенными из обработанных семян. После промораживания закалённых проростков с последующим их раззакаливанием наблюдается снижение содержания сахаров до уровня, который соответствует содержанию сахаров в побегах проростков трёхсуточного возраста. В этих условиях в проростках из обработанных семян, по-прежнему, сохраняется более высокое содержание сахаров. После промораживания раззакалённых растений озимой пшеницы, в отличие от яровой, в проростках, выращенных из обработанных семян, наблюдается большее содержание сахаров по сравнению с контрольными растениями.

Обработка семян озимой пшеницы тебуконазол-содержащим препаратом не только увеличивает содержание водорастворимых углеводов, но и способствует их поддержанию на повышенном уровне как в процессе закаливания, так и после раззакаливания растений с последующим их промораживанием. Можно предположить, что повышенное содержание сахаров в тканях растений будет способствовать увеличению их устойчивости, например к перенесению весенних заморозков в естественных условиях.

На рисунке 20 приведено изменение содержания сахаров в побегах этиолированных проростков озимой ржи, анализируемое по схеме, описанной в начале главы.

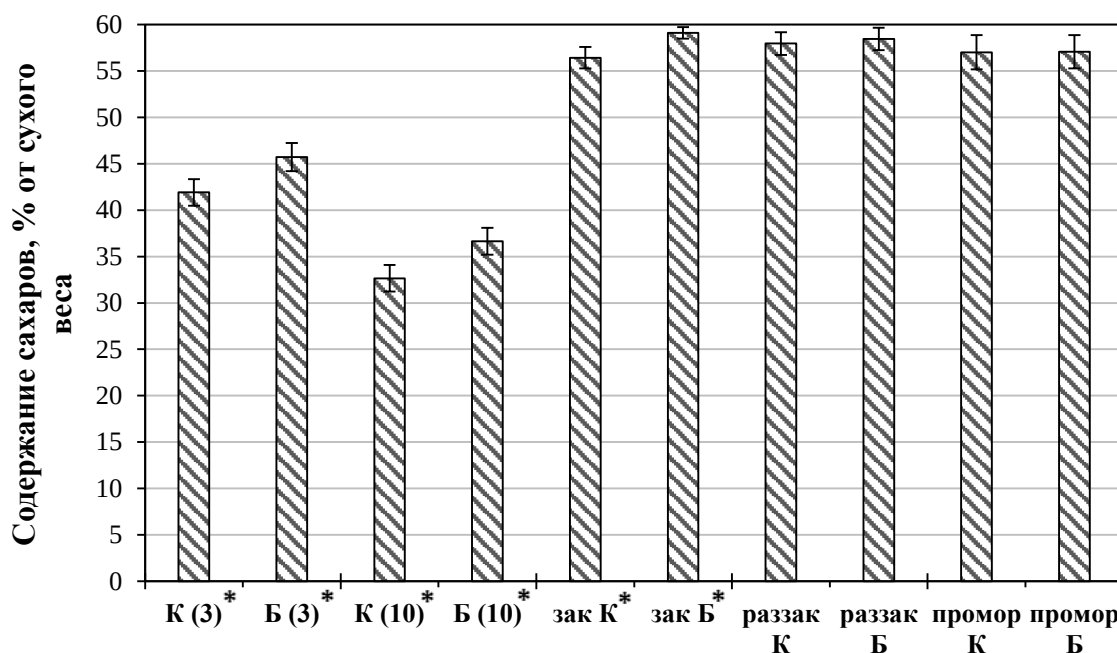


Рис. 20. Влияние препарата «Бункер» на изменение содержания сахаров в этиолированных проростках озимой ржи

Примечание: $n=3$. $M \pm S.D.$ * – различия между вариантами К (3), Б (3), К (10), Б (10), зак К и зак Б статистически значимы ($P < 0,05$). Статистическую значимость отличий определяли по методу LSD Фишера.

Обозначения: как на рис. 18.

Обработка семян озимой ржи препаратом «Бункер» приводила к незначительному (статистически значимому) увеличению содержания водорастворимых углеводов в побегах, выращенных из них проростков, на 3-и и 10-е сутки роста в 1,1 раза. При холодовом закаливании в проростках, выращенных из обработанных семян, содержание сахаров по сравнению с холодозакалённым контролем увеличивалось незначительно. При последующем раззакаливании и промораживании проростков озимой ржи не наблюдалось существенного изменения содержания сахаров, уровень сахаров как у контрольных растений, так и у проростков, выращенных из обработанных семян, оставался примерно на одном уровне – не наблюдалось статистически значимых отличий. Следует отметить, что у проростков озимой ржи по сравнению с озимой и яровой пшеницей на протяжении всего эксперимента наблюдался высокий уровень содержания водорастворимых углеводов (рис. 20). Озимая рожь, являясь одним из самых морозоустойчивых озимых злаков, характеризуется высоким содержанием сахаров в побегах незакалённых и закалённых проростков.

Обработка семян озимой ржи препаратом «Бункер» приводила к незначительному увеличению содержания сахаров.

Анализ изменений в содержании водорастворимых углеводов у злаков с разной степенью морозоустойчивости свидетельствует о различном механизме действия тебуконазол-содержащего препарата на изучаемые злаки. Протравитель не оказывает значительного влияния на метаболизм углеводов растений озимой ржи, тогда как при обработке семян растений яровой и озимой пшеницы препарат приводит к накоплению водорастворимых углеводов, выращенных из них проростков. На растениях озимой пшеницы данное действие протравителя сохраняется более длительное время. Можно предположить, что повышенное содержание сахаров в тканях побегов проростков, выращенных из обработанных препаратом «Бункер» семян, связано с ретардантным эффектом протравителя. Данное предположение согласуется с имеющимися в литературе данными о влиянии ретардантов на изменение углеводного метаболизма злаков. Так, препарат «Моддус» в полевых экспериментах приводил к увеличению содержания сахаров в узлах кущения перезимовавших растений озимой пшеницы (Роньжина и Рейтер, 2015). Принимая во внимание возможность сахаро-зависимой индукции экспрессии генов у растений (Tabaei-Aghdaei et al., 2003) можно предположить, что повышение содержания водорастворимых углеводов под действием тебуконазол-содержащего препарата могло быть одним из факторов, приводящих к индукции синтеза низкомолекулярных дегидринов у пшеницы (см. 3.2.2).

3.2.4. Влияние обработки семян препаратом «Бункер» на изменение интенсивности дыхания тканей яровой пшеницы, озимой пшеницы и озимой ржи при холододовом закаливании и раззакаливании

Методом полярографического анализа определяли интенсивность дыхания этиолированных проростков яровой пшеницы, озимой пшеницы и озимой ржи по скорости поглощения кислорода отрезками тканей побегов злаков. Интенсивность дыхания определяли у растений, выращенных из семян,

необработанных (контрольные растения) и обработанных тебуконазол-содержащим протравителем «Бункер» (1,5 мкл/г семян), в контрольных условиях (при 24 °С), после холодового закаливания (при 2 °С в течение 7 суток) и раззакаливания холодозакалённых проростков (при 4 °С в течение 12 часов).

На рисунке 21 представлено изменение интенсивности дыхания тканей побегов контрольных растений изучаемых злаков.

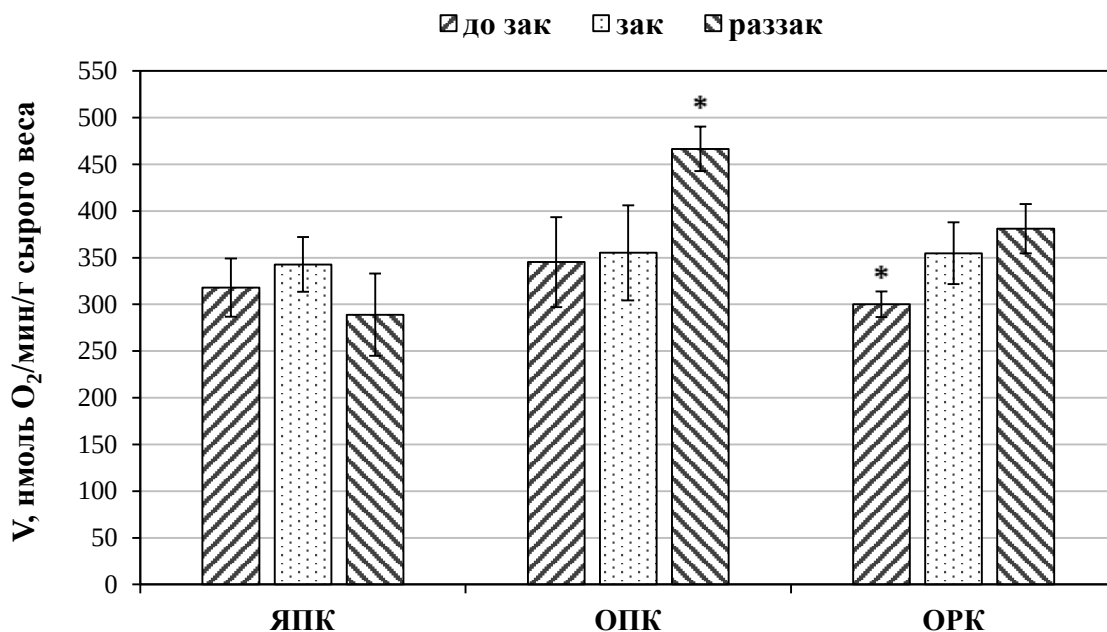


Рис. 21. Интенсивность дыхания тканей побегов этиолированных проростков изучаемых злаков, выращенных из необработанных препаратом «Бункер» семян

Примечание: $n=3$. $M \pm S.D.$ Для вариантов ОПК: * – между вариантами ОПК (до зак и зак) и вариантом ОПК (раззак) обнаружены статистически значимые отличия; для вариантов ОРК: * – между вариантом ОРК (до зак) и вариантами ОРК (зак и раззак) обнаружены статистически значимые отличия. Статистическую значимость отличий ($P \leq 0,05$) определяли по методу LSD Фишера.

Обозначения: V – общая скорость поглощения кислорода; ЯПК, ОПК, ОРК – проростки яровой пшеницы, озимой пшеницы и озимой ржи, выращенные из необработанных препаратом «Бункер» семян (контрольные проростки); до зак – 3-х суточные проростки, выращенные при 24 °С («до закаливания»); зак – закалённые при 2 °С проростки (в течение 7 суток); раззак – раззакалённые при 4 °С проростки (в течение 12 часов).

При закаливании проростков озимой ржи, выращенных из необработанных препаратом «Бункер» семян, интенсивность дыхания тканей их побегов статистически значимо увеличивалась на 18%. Раззакаливание проростков озимой ржи не приводило к статистически значимому изменению интенсивности

дыхания (рис. 21). Способность раззакалённых растений озимой ржи поддерживать интенсивность дыхания на уровне закалённого состояния позволяет им более экономно расходовать сахара, что в естественных условиях защищает растения от резкого снижения температуры (например при наступлении заморозков после весенней оттепели).

У проростков озимой пшеницы наблюдалась противоположная картина изменения интенсивности дыхания: при закаливании растений не происходило её статистически значимого изменения, а при раззакаливании интенсивность дыхания проростков статистически значимо возрастала на 35% (рис. 21). Растения озимой пшеницы в раззакалённом состоянии характеризовались наибольшей интенсивностью дыхания среди изучаемых злаков. Такое резкое увеличение интенсивности дыхания при выходе проростков озимой пшеницы из состояния покоя (при раззакаливании), возможно, и является одной из основных причин гибели растений озимой пшеницы в весенний период при повторном наступлении заморозков (Поморцев, 2013; Поморцев и др., 2013).

У проростков яровой пшеницы при закаливании и раззакаливании не наблюдалось значительного изменения интенсивности дыхания по сравнению с дыханием незакалённых растений (не обнаружено статистически значимых отличий), тем не менее, присутствовала тенденция к увеличению интенсивности дыхания в закалённом состоянии и к уменьшению при раззакаливании (рис. 21).

Изменение интенсивности дыхания тканей побегов изучаемых злаков, выращенных из семян, обработанных тебуконазол-содержащим препаратом «Бункер», представлено на рисунке 22.

При закаливании проростков яровой пшеницы, выращенных из обработанных препаратом «Бункер» семян, присутствовала тенденция к увеличению интенсивности дыхания тканей их побегов. Раззакаливание проростков яровой пшеницы приводило к снижению интенсивности дыхания тканей побегов растений до уровня незакалённых проростков (рис. 22).

Обработка семян озимой ржи протравителем «Бункер» не оказывала существенного влияния на изменение интенсивности дыхания тканей побегов,

выращенных из них проростков. Интенсивность дыхания незакалённых растений из обработанных семян статистически не отличалась от интенсивности дыхания проростков после закаливания и раззакаливания (рис. 22).

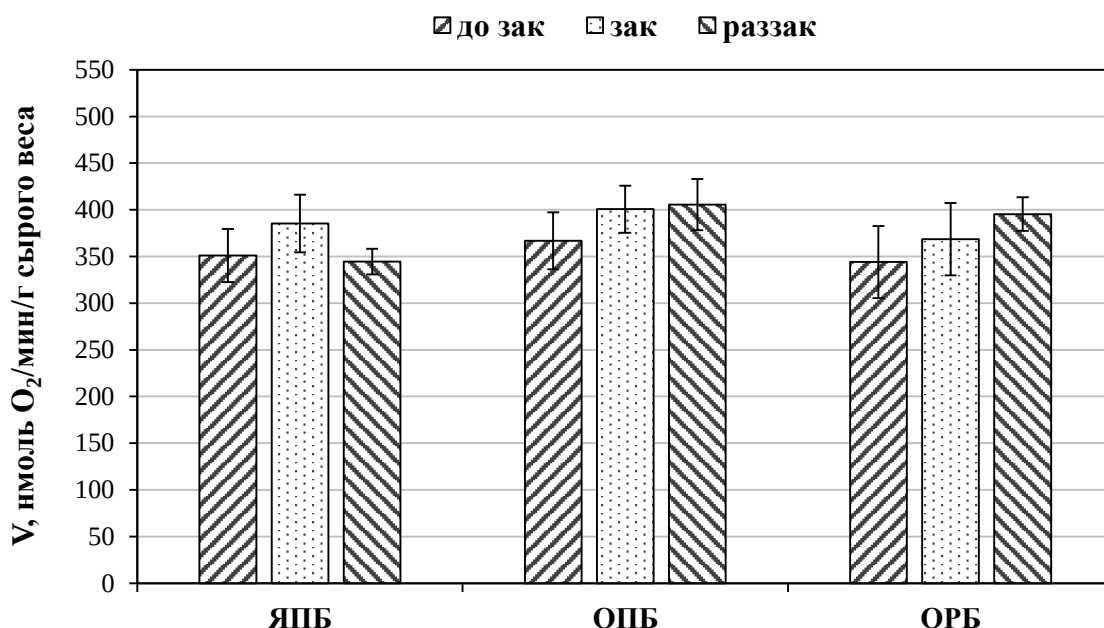


Рис. 22. Интенсивность дыхания тканей побегов этиолированных проростков изучаемых злаков, выращенных из обработанных препаратом «Бункер» семян

Примечание: $n=3$. $M \pm S.D.$

Обозначения: V – общая скорость поглощения кислорода; ЯПБ, ОПБ, ОРБ – проростки яровой пшеницы, озимой пшеницы и озимой ржи, выращенные из обработанных препаратом «Бункер» семян; до зак – 3-х суточные проростки, выращенные при 24 °С («до закаливания»); зак – закалённые при 2 °С проростки (в течение 7 суток); раззак – раззакалённые при 4 °С проростки (в течение 12 часов).

Аналогичный эффект протравитель «Бункер» оказывал и на растения озимой пшеницы. У этиолированных проростков озимой пшеницы, выращенных из обработанных препаратом «Бункер» семян, не наблюдалось статистически значимого изменения интенсивности дыхания при их закаливании (хотя тенденция к увеличению имеется) и раззакаливании (рис. 22). Таким образом, при раззакаливании проростков озимой пшеницы из семян, обработанных протравителем «Бункер», в отличие от проростков озимой пшеницы из необработанных семян, интенсивность дыхания их тканей поддерживалась на уровне закалённых растений.

Данные, полученные при изучении изменения интенсивности дыхания проростков из обработанных семян исследуемых злаков в условиях закаливания и раззакаливания, согласуются с данными по изменению содержания сахаров в этих условиях (см. 3.2.3). Поддержание интенсивности дыхания проростков на неизменном уровне в период раззакаливания растений приводит к сохранению содержания сахаров в тканях, что может играть важную роль для повышения устойчивости растений при возвращении низких неблагоприятных температур.

Известно, что у озимых злаков на фоне торможения или прекращения роста растений в период закаливания к холоду в листьях возрастает соотношение фотосинтез/дыхание (Климов, 1998), накапливаются водорастворимые углеводы, происходит их отток из листьев в узлы кущения, и именно этот орган обеспечивает восстановление роста весной и дальнейшее развитие растений (Дорофеев и др., 2004). Несмотря на высокую морозостойкость узла кущения озимых злаков очень часто наблюдаются повреждения и гибель растений во время их выхода из зимнего покоя (Дорофеев и др., 2004). Как оказалось, в этот период существуют различия в содержании сахаров и интенсивности дыхания узлов кущения озимых злаков с различной степенью морозоустойчивости (пшеница, тритикале, рожь) (Поморцев, 2013; Поморцев и др., 2013). Временное потепление приводило к активации дыхания и расходованию водорастворимых углеводов в узлах кущения озимой пшеницы и к гибели растений при последующем действии отрицательных температур. В то же время растения ржи и тритикале, сохраняя стабильное дыхание в период действия положительных температур, почти полностью выживали при отрицательных температурах (Поморцев, 2013; Поморцев и др., 2013). Полученные нами данные свидетельствуют, что обработка семян тебуконазол-содержащим препаратом «Бункер» приводит к более медленной активации дыхания в тканях побегов озимой пшеницы в условиях раззакаливания растений и позволяет поддерживать содержание сахаров в тканях на более высоком уровне, что может играть важную роль для устойчивости растений в весенний период при возвращении низких неблагоприятных температур.

3.3. ВЛИЯНИЕ ТЕБУКОНАЗОЛ-СОДЕРЖАЩЕГО ПРОТРАВИТЕЛЯ СЕМЯН «БУНКЕР» НА ХОЛОДО- И МОРОЗОУСТОЙЧИВОСТЬ ЗЛАКОВ ПРИ ЗАКАЛИВАНИИ И ПОСЛЕ РАЗЗАКАЛИВАНИЯ

Морозоустойчивость растений генетически обусловлена, её повышение достигается путём низкотемпературного закаливания, в процессе которого растения претерпевают ряд сложных структурно-биохимических изменений, в числе которых накопление водорастворимых углеводов и низкомолекулярных белков, увеличение степени ненасыщенности ЖК мембранных липидов, изменение интенсивности дыхания и т.д. (Чиркова, 2002; Трунова, 2007; Кошкин, 2010; Косулина и др., 2011). В литературе имеются данные, свидетельствующие о повышении морозоустойчивости растений после их обработки ретардантами триазольной природы (Прусакова и Чинова, 1998).

В связи с этим в нашей работе изучалось влияние тебуконазол-содержащего протравителя «Бункер» (1,5 мкл/г семян) на изменение холодо- и морозоустойчивости холодозакалённых (при 2 °С в течение 7 суток) проростков яровой пшеницы, озимой пшеницы и озимой ржи. Для этого сравнивали выживаемость холодозакалённых проростков исследуемых злаков, выращенных из необработанных (контроль) и обработанных препаратом «Бункер» семян, после их промораживания при температурах –6, –7, –8 и –10 °С (в течение 24 часов) (табл. 4), а также после их раззакаливания (при 4 °С в течение 12 часов) с последующим промораживанием при –6 °С (в течение 24 часов) (табл. 5). В связи с тем, что распределение полученных данных отличалось от нормального, результаты в таблицах представлены в виде медианы (Me), а разброс значений – в виде интерквартильной широты [25%;75% процентиль].

Обработка семян изучаемых злаков тебуконазол-содержащим протравителем «Бункер» приводила к повышению холодо- и морозоустойчивости выращенных из них проростков при закаливании и после раззакаливания (табл. 4 и 5).

Таблица 4

Выживаемость холодозакалённых проростков злаков, выращенных из семян необработанных (Контроль) и обработанных препаратом «Бункер»

Выживаемость (%)							
холодозакалённых проростков яровой пшеницы							
–6 °С*, 24 часа		–7 °С*, 24 часа		–8 °С*, 24 часа		–10 °С*, 24 часа	
Контроль	«Бункер»	Контроль	«Бункер»	Контроль	«Бункер»	Контроль	«Бункер»
58	100	30	85	0	37	0	25
[57,8;59,5]	[100;100]	[29,3;30,8]	[84,2;85,0]	[0;0]	[36,8;38,4]	[0;0]	[24,6;26,3]
Выживаемость (%)							
холодозакалённых проростков озимой пшеницы							
–6 °С*, 24 часа		–7 °С*, 24 часа		–8 °С*, 24 часа		–10 °С*, 24 часа	
Контроль	«Бункер»	Контроль	«Бункер»	Контроль	«Бункер»	Контроль	«Бункер»
97	100	70	95	46	73	26	66
[95,8;98,0]	[100;100]	[67,8;71,5]	[93,8;97,3]	[43,0;47,3]	[71,5;74,0]	[23,0;27,5]	[64,5;68,3]
Выживаемость (%)							
холодозакалённых проростков озимой ржи							
–6 °С, 24 часа		–7 °С, 24 часа		–8 °С, 24 часа		–10 °С, 24 часа	
Контроль	«Бункер»	Контроль	«Бункер»	Контроль	«Бункер»	Контроль	«Бункер»
100	100	100	100	100	100	100	100
[100;100]	[100;100]	[100;100]	[100;100]	[100;100]	[100;100]	[100;100]	[100;100]

Примечание: n=6. Ме [25%;75%]. Холодовое закаливание 3-х суточных проростков злаков проводили в течение 7 суток при 2 °С. * – различия между вариантом Контроль и вариантом «Бункер» статистически значимы ($P<0,05$). Статистическую значимость отличий определяли с помощью Н-критерия Краскела-Уоллиса.

Таблица 5

Выживаемость раззакалённых проростков злаков, выращенных из семян необработанных (Контроль) и обработанных препаратом «Бункер», после промораживания при температуре –6 °С в течение 24 часов

Культура	Выживаемость (%) раззакалённых проростков	
	Контроль	«Бункер»
Яровая пшеница	0 [0;0]	10 [9,6;10,3]
Озимая пшеница	33 [30,3;34,5]	51 [49,5;52,3]
Озимая рожь	100 [100;100]	100 [100;100]

Примечание: n=6. Ме [25%;75%]. Раззакаливание холодозакалённых проростков проводили в течение 12 часов при 4 °С.

Озимая рожь является самым устойчивым злаком, среди исследуемых, к действию отрицательных температур. Выживаемость растений озимой ржи при всех вариантах промораживания (независимо от варианта опыта) составляла 100% (табл. 4 и 5).

Холодозакалённая озимая пшеница, выращенная из обработанных препаратом «Бункер» семян, была устойчивее при промораживании, нежели контрольные растения. Так, при температуре -10°C выживаемость холодозакалённых проростков озимой пшеницы из обработанных препаратом семян превысила выживаемость контрольных растений в 2,5 раза, при температуре -8°C – в 1,6 раза, а при температуре -7°C – в 1,4 раза. Устойчивость холодозакалённых проростков яровой пшеницы, выращенных из семян, обработанных препаратом «Бункер», при их промораживании температурами -8°C и -10°C составляла 37% и 25%, соответственно, тогда как контрольные растения при данных температурных обработках погибали. При температуре -7°C выживаемость холодозакалённых проростков яровой пшеницы из обработанных препаратом семян превысила выживаемость контрольных растений в 2,8 раза, а при температуре -6°C – в 1,7 раза (табл. 4).

Раззакалённые проростки яровой и озимой пшеницы, выращенные из семян, обработанных препаратом «Бункер», выживали после промораживания при -6°C , их выживаемость составляла 10% и 51% (табл. 5), соответственно, в то время как контрольные раззакалённые растения яровой пшеницы погибали полностью, а выживаемость раззакалённых контрольных растений озимой пшеницы снижалась в 1,5 раза (табл. 5).

Таким образом, увеличение холодо- и морозоустойчивости яровой и озимой пшеницы, семена которых были обработаны тебуконазол-содержащим препаратом «Бункер», связано с влиянием действующего вещества препарата на ряд структурных и физиолого-биохимических параметров в клетках и тканях растений (ингибирование роста, увеличение степени ненасыщенности жирных кислот, синтез низкомолекулярных дегидринов, увеличение содержания водорастворимых углеводов).

3.4. ВЛИЯНИЕ РОСТИНГИБИРУЮЩИХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ И ФОСФОРИЛИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ПШЕНИЦЫ

3.4.1. Окислительная и фосфорилирующая активность митохондрий при использовании препарата «Бункер» и тебуконазола в контрольных условиях

Для изучения влияния тебуконазол-содержащего протравителя семян «Бункер» и тебуконазола на энергетические параметры растительных митохондрий анализировали скорость фосфорилирующего дыхания (V_3), скорость нефосфорилирующего дыхания (V_4), КДК и отношение АДФ:О в митохондриях, изолированных из побегов этиолированных проростков озимой пшеницы, окисляющих различные субстраты. Параметры КДК и АДФ:О характеризуют эффективность окислительного фосфорилирования при функционировании митохондрий. Субстраты выбирались таким образом, чтобы при их окислении транспорт электронов начинался с определённого комплекса дыхательной цепи: малат – транспорт электронов начинается с комплекса I дыхательной цепи, сукцинат – транспорт электронов начинается с комплекса II дыхательной цепи, НАД·Н – транспорт электронов начинается с «внешней» ротенон-резистентной НАД·Н-дегидрогеназы и электроны передаются на комплекс III дыхательной цепи, аскорбат+ТМФД – транспорт электронов начинается с комплекса IV дыхательной цепи. Использовали концентрацию тебуконазола (1 мМ), которая приводила к сходному с препаратом «Бункер» (1,5 мкл/г семян) ингибированию длины coleoptiles побегов проростков изучаемых злаков (рис. 11).

В таблице 6 представлены значения, характеризующие окислительную и фосфорилирующую активность митохондрий проростков озимой пшеницы в контрольных условиях и после применения ингибиторов. Как оказалось, скорость окисления митохондрий озимой пшеницы из контрольных побегов зависела от используемого субстрата: была наименьшей при использовании

малата и наибольшей при использовании аскорбата с ТМФД. При этом отношение АДФ:О при окислении митохондриями малата, сукцината и аскорбата с ТМФД было близко к теоретическому (около 3 для малата, 2 для сукцината и 1 для аскорбата с ТМФД), что свидетельствует об эффективности окислительного фосфорилирования в митохондриях (табл. 6).

Таблица 6

Влияние препарата «Бункер» и тебуконазола на окислительную и фосфорилирующую активность митохондрий озимой пшеницы из побегов этиолированных проростков, выращенных при 24 °С

Субстрат окисления	Контроль							
	V ₃		V ₄		КДК		АДФ:О	
мал+глу	56,46 [53,08;60,03]		18,96 [17,11;22,00]		3,12 [2,40;3,41]		2,79 [2,51;3,01]	
сукц+глу	67,89 [65,50;71,39]		35,47 [31,59;38,30]		2,03 [1,71;2,14]		1,98 [1,73;2,11]	
НАД·Н	75,0 [73,9;80,3]		68,21 [62,63;72,89]		1,13 [1,07;1,18]		0,77 [0,50;0,93]	
аск+ТМФД	90,2 [87,5;92,6]		70,81 [63,76;72,05]		1,31 [1,26;1,39]		0,83 [0,76;0,95]	
Субстрат окисления	препарат «Бункер»				Тебуконазол			
	V ₃	V ₄	КДК	АДФ:О	V ₃	V ₄	КДК	АДФ:О
мал+глу	40,36* [35,40; 42,43]	14,65* [13,93; 15,95]	2,74* [2,16; 2,94]	2,84 [2,68; 3,15]	34,61* [32,15; 37,62]	18,23* [15,26; 19,85]	1,92* [1,73; 2,07]	2,64 [2,48; 2,85]
сукц+глу	48,76* [43,96; 49,82]	22,16* [17,05; 25,2]	2,20* [1,86; 2,74]	2,01 [1,61; 2,10]	54,91 [47,31; 65,56]	30,74 [27,66; 34,39]	1,81 [1,67; 1,93]	1,62 [1,46; 1,79]
НАД·Н	49,19* [48,06; 53,46]	43,80* [42,00; 46,04]	1,14 [1,12; 1,16]	0,85 [0,47; 0,96]	73,31 [66,68; 81,90]	52,56 [45,02; 67,91]	1,40 [1,20; 1,51]	0,81 [0,79; 0,87]
аск+ТМФД	50,28* [43,94; 53,28]	40,20* [35,20; 44,28]	1,25 [1,14; 1,32]	1,05 [0,93; 1,18]	85,08 [81,63; 92,40]	67,98 [57,31; 70,14]	1,32 [1,20; 1,49]	0,79 [0,76; 1,21]

Примечание: субстраты окисления – 10 мМ малат+10 мМ глутамат, 8 мМ сукцинат+5 мМ глутамат, 1 мМ НАД·Н, 2 мМ аскорбат+0,2 мМ ТМФД. n=4. Ме [25%;75%]. * – различия между вариантом Контроль и исследуемым вариантом статистически значимы (P<0,05). Статистическую значимость отличий определяли с помощью Н-критерия Краскела-Уоллиса.

Обозначения: Контроль – митохондрии, изолированные из побегов 3-х суточных проростков, выращенных из необработанных семян при 24 °С; препарат «Бункер» – митохондрии, изолированные из побегов 3-х суточных проростков, выращенных из семян, обработанных препаратом «Бункер» (1,5 мкл/г семян) при 24 °С; Тебуконазол – митохондрии, изолированные из побегов 3-х суточных проростков, выращенных при 24 °С в течение 2 суток в отсутствие обработок и 1 сутки на растворе 1 мМ тебуконазола.

У проростков озимой пшеницы, выращенных из обработанных препаратом «Бункер» семян, наблюдалось значительное снижение скоростей дыхания изолированных из них митохондрий независимо от используемого субстрата окисления. Ингибирование препаратом «Бункер» скорости фосфорилирующего дыхания составляло 28-44%, скорости нефосфорилирующего дыхания – 22-43%. Снижение скорости фосфорилирующего дыхания митохондрий при окислении малата сопровождалось падением КДК и не влияло на значение отношения АДФ:О. При окислении митохондриями других субстратов снижения КДК не наблюдалось, а при окислении сукцината КДК увеличивался на 8% (табл. 6).

Обработка проростков тебуконазолом имела сходный с действием препарата «Бункер» эффект при окислении митохондриями малата. Скорость фосфорилирующего дыхания митохондрий из тебуконазол-обработанных проростков при окислении малата была ниже на 39%, а нефосфорилирующего дыхания – на 4%. Как и в случае препарата «Бункер», тебуконазол приводил к снижению КДК при окислении малата, при этом не оказывал значимого влияния на АДФ:О. В отличие от препарата «Бункер» обработка проростков тебуконазолом не приводила к статистически значимому снижению скоростей дыхания митохондрий при окислении сукцината, НАД·Н, аскорбата+ТМФД (табл. 6). Полученные данные свидетельствуют о том, что влияние препарата «Бункер» на параметры митохондрий опосредовано не только действием входящего в его состав тебуконазола, но и дополнительных соединений.

В связи с тем, что тебуконазол, как и тебуконазол-содержащий препарат «Бункер», эффективно ингибировал скорости фосфорилирующего и нефосфорилирующего дыхания митохондрий озимой пшеницы при окислении малата и приводил к снижению КДК, можно говорить о том, что действие тебуконазола направлено в большей мере на функционирование комплекса I дыхательной цепи. Полученные данные согласуются с имеющимися в литературе данными о влиянии системных фунгицидов (витавакса, плантвакса и байлетона – производное 1,2,4-триазола) на дыхание корней проростков пшеницы (Сафина-Осташевская и Гордон, 1984). Как было показано авторами,

фунгициды оказывают ингибирующий эффект на дыхание корней, связанный с их влиянием на электрон-транспортную цепь (ЭТЦ) митохондрий, при этом не затрагивается гликолиз и цикл Кребса. Действие фунгицидов было аналогично действию ротенона (ингибитору комплекса I ЭТЦ) – как и в случае с ротеноном, ингибирование снималось витамином К₃. Это позволило авторам предположить, что фунгициды действуют на комплекс I ЭТЦ митохондрий растений.

Поскольку протравитель «Бункер» и тебуконазол оказывали влияние на окислительную активность митохондрий, было изучено изменение вклада цитохромного и альтернативного путей в дыхание митохондрий после обработки данными препаратами. С помощью последовательного добавления ингибиторов цитохромного (KCN) и альтернативного (БГК) путей транспорта электронов анализировали потенциальную активность АО в митохондриях из контрольных проростков озимой пшеницы и из проростков, выращенных из обработанных препаратом «Бункер» семян, а также проростков, обработанных тебуконазолом. В митохондриях из контрольных проростков вклад альтернативного пути в дыхание составлял 31% при окислении малата, 19% при окислении сукцината, 11% при окислении НАД·Н (рис. 23).

Более высокая потенциальная активность АО при окислении митохондриями из этиолированных проростков озимой пшеницы малата и сукцината ранее наблюдалась и в других работах, было предположено, что это связано с тем, что при окислении малата или сукцината образуется пируват, который, как известно, является активатором АО (Боровик и др., 2014; Грабельных и др., 2014б).

Как оказалось, тебуконазол не оказывает значительного влияния на потенциальную активность АО в митохондриях озимой пшеницы, в то время как препарат «Бункер» подавляет активность АО при окислении митохондриями большинства изученных субстратов. Обработка проростков тебуконазолом приводила к значительному снижению вклада в дыхание митохондрий цитохромного пути при неизменном вкладе в дыхание АО при окислении митохондриями малата. В то же время тебуконазол оказывал лишь некоторое

влияние на вклад цитохромного пути в дыхание при окислении сукцината, НАД·Н и аскорбата с ТМФД, а на вклад АО в дыхание не оказывал никакого влияния (рис. 23).

Обработка семян препаратом «Бункер» снижала вклад в дыхание изолированных из проростков митохондрий как цитохромного пути, так и альтернативного пути, независимо от использованного субстрата окисления (рис. 23).

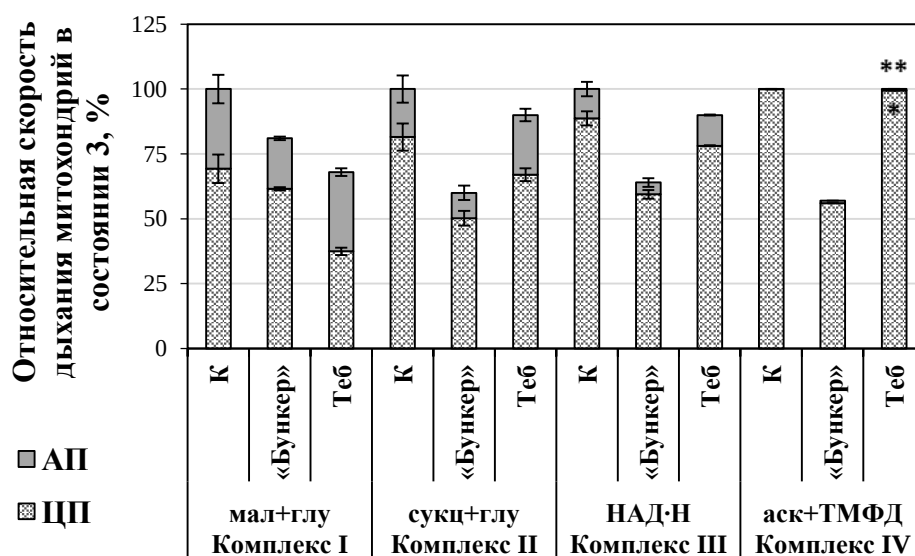


Рис. 23. Влияние препарата «Бункер» и тебуконазола на вклад цитохромного (ЦП) и альтернативного (АП) путей переноса электронов в дыхание митохондрий, изолированных из побегов незакалённых этиолированных проростков озимой пшеницы

Примечание: $n=4$. $M \pm S.D.$ * (ЦП) – между вариантом К и исследуемым вариантом не обнаружено статистически значимых отличий; ** (АП) – между вариантом К и исследуемым вариантом не обнаружено статистически значимых отличий. Статистическую значимость отличий ($P \leq 0,05$) определяли по методу LSD Фишера. За 100% принята скорость фосфорилирующего дыхания (V_3) при окислении субстрата митохондриями проростков из необработанных семян. Субстраты окисления – 10 мМ малат+10 мМ глутамат, 8 мМ сукцинат+5 мМ глутамат, 1 мМ НАД·Н, 2 мМ аскорбат+0,2 мМ ТМФД. Комплексы I, II, III, IV – комплексы ЭТЦ митохондрий.

Обозначения: К – митохондрии, изолированные из побегов 3-х суточных проростков, выращенных из необработанных семян при 24 °С; «Бункер» – митохондрии, изолированные из побегов 3-х суточных проростков, выращенных из семян, обработанных препаратом «Бункер» (1,5 мкл/г семян) при 24 °С; Теб – митохондрии, изолированные из побегов 3-х суточных проростков, выращенных при 24 °С в течение 2 суток в отсутствие обработок и 1 сутки на растворе 1 мМ тебуконазола.

Из этих данных следует, что тебуконазол ингибирует транспорт электронов через комплекс I дыхательной цепи, при этом не влияет на транспорт

электронов по альтернативному пути. В свою очередь препарат «Бункер» в отличие от тебуконазола влияет как на перенос электронов по цитохромному пути, так и на альтернативный путь, вызывая их ингибирование (рис. 23).

Также проводили модельный эксперимент, в котором к изолированным растительным митохондриям в условиях *in vitro* добавляли тебуконазол в различных концентрациях (рис. 24а).

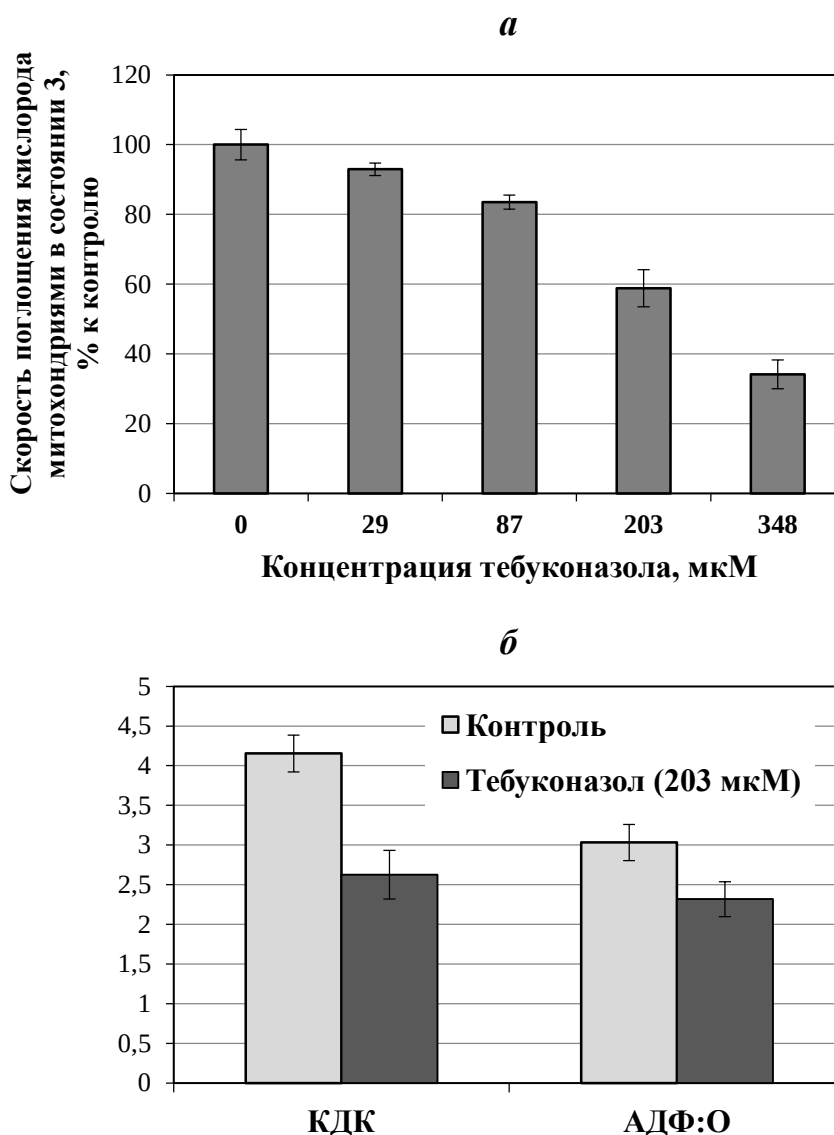


Рис. 24. Влияние тебуконазола на скорость фосфорилирующего дыхания (**а**) и величину КДК и отношение АДФ:О (**б**) митохондрий, изолированных из побегов этиолированных проростков яровой пшеницы, при окислении малата

Примечание: $n=3$. $M \pm S.D.$ Во всех вариантах отличия значимы ($P < 0,05$). Статистическую значимость отличий определяли по методу LSD Фишера. Субстрат окисления – 10 мМ малат+10 мМ глутамат. За 100% (рис. 24а) принята скорость поглощения кислорода в состоянии 3 (фосфорилирующее дыхание) до добавления тебуконазола.

Обозначения: Контроль – суспензия митохондрий из 3-х суточных проростков; Тебуконазол (203 мкМ) – суспензия митохондрий из 3-х суточных проростков при добавлении тебуконазола в концентрации 203 мкМ.

Изучение влияния тебуконазола на окислительную и фосфорилирующую активность митохондрий, изолированных из побегов трёхсуточных этиолированных проростков яровой пшеницы, выявило его явный концентрационно-зависимый ингибирующий эффект на дыхание митохондрий и сопряжение в них процессов окисления и фосфорилирования. При использовании малата в качестве субстрата окисления (транспорт электронов начинается с комплекса I дыхательной цепи) ингибирование скорости фосфорилирующего дыхания (состояние 3) составило 7%, 16%, 41% и 66% при концентрациях тебуконазола 29 мкМ, 87 мкМ, 203 мкМ и 348 мкМ, соответственно (рис. 24а). Ингибирование скорости фосфорилирующего дыхания при неизменной скорости нефосфорилирующего дыхания (состояние 4) сопровождалось снижением КДК и отношения АДФ:О (рис. 24б).

Таким образом, тебуконазол-содержащий препарат «Бункер» и тебуконазол оказывают влияние на окислительную и фосфорилирующую активность растительных митохондрий, а также на изменение потока электронов по цитохромному и альтернативному путям транспорта. Ингибирование скорости окисления субстратов митохондриями под действием тебуконазола и тебуконазол-содержащего препарата может объяснять более медленное расходование сахаров в процессе роста побегов злаков (см. 3.2.3) и может быть одним из факторов повышения холодо- и морозоустойчивости злаков (см. 3.3).

3.4.2. Окислительная и фосфорилирующая активность митохондрий при использовании препарата «Бункер» и тебуконазола при холодовом закаливании

Далее анализировали, как влияет предварительная обработка семян препаратом «Бункер» (1,5 мкл/г семян) и проростков тебуконазолом (1 мМ) на способность этиолированных проростков озимой пшеницы к закаливанию, и происходят ли при этом изменения митохондриальной активности. Митохондрии выделяли из побегов проростков, закалённых в течение 7 суток при 2 °С, контрольных растений и растений, обработанных, как было описано

ранее, протравителем «Бункер» и тебуконазолом. При изучении окислительной и фосфорилирующей активности митохондрий использовали те же субстраты окисления, что и при анализе митохондрий из незакалённых проростков: малат в присутствии глутамата, сукцинат в присутствии глутамата, НАД·Н и аскорбат+ТМФД (см. 3.4.1).

Холодовое закаливание контрольных проростков озимой пшеницы сопровождалось снижением скоростей как фосфорилирующего, так и нефосфорилирующего дыхания в изолированных из них митохондриях независимо от используемых субстратов окисления (табл. 6, 7). Снижение скоростей дыхания не приводило к существенному снижению эффективности окислительного фосфорилирования, так показатели КДК и АДФ:О оставались на уровне контрольных митохондрий при окислении НАД·Н и аскорбата с ТМФД. При окислении малата и сукцината показатели КДК и АДФ:О снижались незначительно (табл. 6, 7).

У закалённых этиолированных проростков озимой пшеницы, выращенных из семян, обработанных препаратом «Бункер», наблюдали незначительную тенденцию к увеличению скоростей дыхания митохондрий при окислении малата и аскорбата с ТМФД, однако при этом значение КДК и АДФ:О не изменялось. При использовании в качестве субстрата окисления сукцината и НАД·Н, наоборот, наблюдали снижение скоростей дыхания митохондрий и небольшое увеличение показателей КДК и АДФ:О (табл. 7).

Энергетическая активность митохондрий, изолированных из проростков озимой пшеницы, обработанных тебуконазолом с последующим их закаливанием, отличалась от таковой в митохондриях из незакалённых растений, обработанных тебуконазолом. Так, при обработке тебуконазолом незакалённых проростков происходило снижение скорости дыхания митохондрий (см. 3.4.1), а последующее закаливание этих проростков, наоборот, приводило к незначительной стимуляции дыхания выделенных из них митохондрий при окислении всех изученных субстратов и увеличению показателей КДК и АДФ:О (табл. 7).

Таблица 7

Влияние препарата «Бункер» и тебуконазола на окислительную и фосфорилирующую активность митохондрий озимой пшеницы из побегов этиолированных закалённых проростков

Субстрат окисления	Холод.зак.							
	V ₃		V ₄		КДК		АДФ:О	
мал+глу	35,82 [33,18;40,21]		12,58 [11,41;16,11]		2,59 [2,41;3,10]		2,56 [2,34;2,60]	
сукц+глу	46,01 [44,17;48,21]		26,86 [25,00;29,06]		1,72 [1,61;1,86]		1,71 [1,20;2,11]	
НАД·Н	60,16 [49,11;62,66]		48,78 [42,79;53,67]		1,15 [1,12;1,18]		0,94 [0,75;0,99]	
аск+ТМФД	57,34 [55,81;64,97]		43,69 [39,62;54,00]		1,29 [1,18;1,45]		0,95 [0,87;1,23]	
Субстрат окисления	препарат «Бункер»				Тебуконазол			
	V ₃		V ₄		КДК		АДФ:О	
мал+глу	35,22 [30,94; 42,74]		15,68 [13,28; 17,47]		2,69 [1,90; 2,79]		2,53 [2,35; 3,20]	
сукц+глу	41,24 [38,72; 55,05]		24,58 [24,08; 25,13]		1,71 [1,57; 2,20]		1,79 [1,36; 1,90]	
НАД·Н	44,89 [38,84; 50,63]		37,01 [34,58; 44,12]		1,17 [1,09; 1,20]		1,27 [0,91; 1,39]	
аск+ТМФД	63,58 [50,74; 69,71]		45,99 [37,36; 54,94]		1,31 [1,21; 1,51]		0,81 [0,62; 1,05]	

Примечание: субстраты окисления – 10 мМ малат+10 мМ глутамат, 8 мМ сукцинат+5 мМ глутамат, 1 мМ НАД·Н, 2 мМ аскорбат+0,2 мМ ТМФД. n=4. Ме [25%;75%].

Обозначения: Холод.зак. – митохондрии, изолированные из побегов проростков, закалённых при 2 °С (в течение 7 суток); препарат «Бункер» – митохондрии, изолированные из побегов проростков, выращенных из семян, обработанных препаратом «Бункер» (1,5 мкл/г семян) и закалённых при 2 °С (в течение 7 суток); Тебуконазол – митохондрии, изолированные из побегов 3-х суточных проростков, выращенных при 24 °С в течение 2 суток в отсутствие обработок и 1 сутки на растворе 1 мМ тебуконазола и закалённых при 2 °С (в течение 7 суток).

В данном случае можно говорить о поддержании скоростей дыхания митохондрий и степени сопряжения процессов окислительного фосфорилирования под действием обработки тебуконазолом в условиях холодового закаливания на уровне, необходимом для обеспечения синтетических процессов при закаливании.

Наряду с изменением скорости дыхания митохондрий после холодового закаливания проростков изменялся вклад АП в дыхание. Холодовое закаливание этиолированных проростков озимой пшеницы приводило к некоторому повышению вклада АП в дыхание митохондрий при окислении ими малата и сукцината (до 36% и 21%, соответственно) (рис. 23, 25).

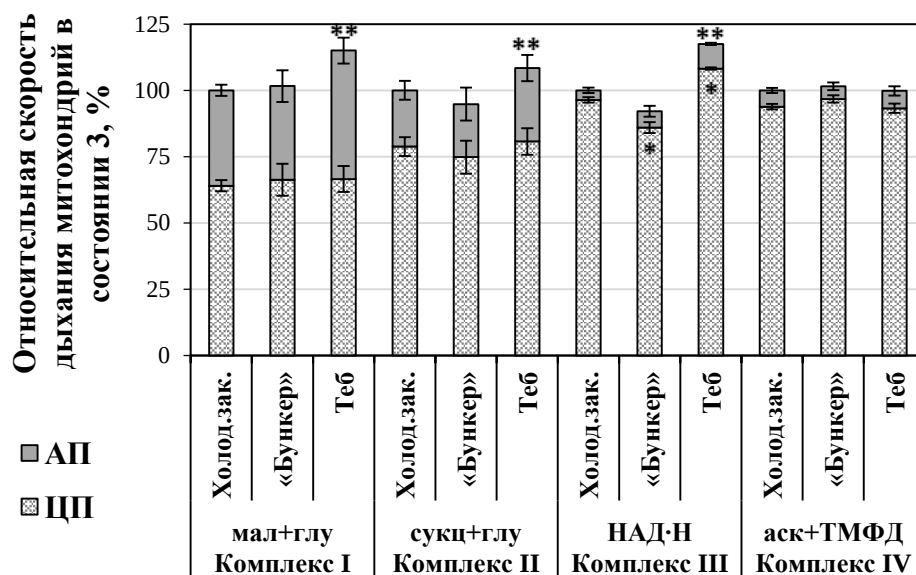


Рис. 25. Влияние препарата «Бункер» и тебуконазола на вклад цитохромного (ЦП) и альтернативного (АП) путей переноса электронов в дыхание митохондрий, изолированных из побегов холодозакалённых этиолированных проростков озимой пшеницы

Примечание: $n=4$. $M \pm S.D.$ * (ЦП) – различия между вариантом Холод.зак. и исследуемым вариантом статистически значимы; ** (АП) – различия между вариантом Холод.зак. и исследуемым вариантом статистически значимы. Статистическую значимость отличий ($P \leq 0,05$) определяли по методу LSD Фишера. За 100% принята скорость фосфорилирующего дыхания (V_3) при окислении субстрата митохондриями холодозакалённых проростков из необработанных семян. Субстраты окисления – 10 мМ малат+10 мМ глутамат, 8 мМ сукцинат+5 мМ глутамат, 1 мМ НАД·Н, 2 мМ аскорбат+0,2 мМ ТМФД. Комплексы I, II, III, IV – комплексы ЭТЦ митохондрий.

Обозначения: Холод.зак. – митохондрии, изолированные из побегов проростков, закалённых при 2 °С (в течение 7 суток); «Бункер» – митохондрии, изолированные из побегов проростков, выращенных из семян, обработанных препаратом «Бункер» (1,5 мкл/г семян) и закалённых при 2 °С (в течение 7 суток); Теб – митохондрии, изолированные из побегов 3-х суточных проростков, выращенных при 24 °С в течение 2 суток в отсутствие обработок и 1 сутки на растворе 1 мМ тебуконазола и закалённых при 2 °С (в течение 7 суток).

При окислении малата и сукцината митохондриями, изолированными из побегов холодозакалённых проростков озимой пшеницы, выращенных из обработанных препаратом «Бункер» семян, вклад АП в дыхание увеличивался незначительно, а вклад ЦП не изменялся. При окислении НАД·Н наблюдалось

статистически значимое снижение вклада ЦП и незначительное увеличение вклада АП в дыхание митохондрий из побегов холодозакалённых проростков озимой пшеницы, выращенных из обработанных препаратом «Бункер» семян. При окислении аскорбата с ТМФД митохондриями холодозакалённых проростков озимой пшеницы из обработанных препаратом «Бункер» семян не происходило статистически значимого изменения вклада ЦП и АП в дыхание (рис. 25).

Обработка этиолированных проростков озимой пшеницы тебуконазолом с последующим холодовым закаливанием проростков приводила к статистически значимому увеличению вклада АП в дыхание при окислении митохондриями малата и сукцината, при этом вклад ЦП в дыхание митохондрий не изменялся. При окислении НАД·Н статистически значимо увеличивался вклад как ЦП, так и АП в дыхание митохондрий, а при окислении аскорбата с ТМФД вклад ЦП и АП не изменялся (рис. 25).

Таким образом, тебуконазол-содержащий препарат «Бункер» и тебуконазол влияют на окислительную и фосфорилирующую активность митохондрий озимой пшеницы и вклад в дыхание цитохромного и альтернативного путей переноса электронов как при обычной температуре выращивания (см. 3.4.1), так и при закаливании. Их действие на скорость окисления субстратов митохондриями зависит от температуры, при которой находились проростки. Учитывая, что препарат «Бункер» и тебуконазол оказывают ростингибирующее действие на проростки злаков (см. 3.1.1), и при этом митохондрии, изолированные из таких проростков, обладают сниженным дыханием, можно полагать, что такое изменение носит адаптивный характер и направлено на снижение потребления субстратов дыхания, в первую очередь сахаров, и повышение устойчивости растений в контрольных условиях. При холодовом закаливании реализуется другой защитный механизм, направленный на поддержание скоростей дыхания митохондрий и активацию альтернативного пути, связанного с функционированием АО, которая играет важную роль при адаптации растений к холоду (Грабельных и др., 2014б). У пшеницы АО

кодируется двумя генами – *WAOX1a* и *WAOX1c*. Повышенное содержание транскриптов этих генов, наблюдаемое при закаливании растений к холоду, сопровождается увеличением способности АО к транспорту электронов, которое зависит от степени морозоустойчивости пшеницы (Mizuno et al., 2008). Возможная функция АО при закаливании к холоду заключается в снижении генерации АФК (Грабельных и др., 2011; Sugie et al., 2006), образующихся при действии низких температур на растения (Грабельных и др., 2014a). Обработка проростков озимой пшеницы тебуконазолом приводит к активации АО при закаливании, что может предотвращать развитие окислительного стресса в условиях действия низких температур и способствовать повышению выживаемости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Физиолого-биохимические изменения, происходящие в клетках холодо- и морозоустойчивых растений в процессе низкотемпературного закаливания, направлены на предотвращение образования внутриклеточного льда и снижение последствий обезвоживания, вызванных образованием внеклеточного льда. Во время холодового закаливания происходит приостановка ростовых процессов растений, осуществляющаяся вследствие смещения гормонального баланса в сторону увеличения ингибиторов роста, главным образом АБК (Касперска-Палач, 1983; Лукаткин, 2002; Трунова, 2007; Кузнецов и Дмитриева, 2011; Титов и Таланова, 2011). Увеличение проницаемости мембран достигается путём увеличения содержания фосфолипидов и повышения степени ненасыщенности жирных кислот мембранных липидов, снижения содержания стерина в мембранах. Обезвоживание предотвращается повышением осмотического потенциала клетки при увеличении содержания криопротекторных веществ, осмолитов: водорастворимых углеводов и белков, пролина и других аминокислот, полиаминов. Белки-дегидрины проявляют криопротекторную и антифризную активности и предотвращают деградацию и коагуляцию ряда макромолекул клеточных структур при обезвоживании их внеклеточным льдом (Close, 1997; Rorat, 2006; Hara, 2010). Синтез ряда дегидринов имеет АБК-зависимый характер (Шакирова и др., 2009; Таланова и др., 2011; Титов и Таланова, 2011; Theocharis et al., 2012).

В осенний период у озимых злаков на фоне торможения или прекращения роста растений в период закаливания к холоду в листьях возрастает соотношение фотосинтез/дыхание, накапливаются водорастворимые углеводы, происходит их отток из листьев в узлы кущения. Накоплению сахаров при закаливании способствует сниженная интенсивность дыхания на фоне сохраняющегося фотосинтеза (Климов, 1998). Узел кущения является хранилищем сахаров и других криопротекторных соединений, и именно он обеспечивает восстановление роста растений весной и их дальнейшее развитие. Несмотря на

высокую морозостойкость узла кущения озимых злаков очень часто наблюдаются повреждения и гибель растений во время их выхода из зимнего покоя (Дорофеев и др., 2004). Данное явление характерно для Восточной Сибири с её резко-континентальным климатом и нестабильным зимне-весенним температурным режимом. Внезапное повышение температуры в результате оттепелей поздней зимой может вызвать раззакаливание зимующих растений в нехарактерный для этого период времени, при этом морозостойкость растений снижается всего за несколько дней (Chen and Li, 1980). Последующие даже небольшие заморозки могут вызвать гибель раззакалённых растений (Eagles and Williams, 1992; Kalberer et al., 2006). В связи с этим способность выдерживать зимний период озимыми культурами будет определяться не только их морозоустойчивостью, сформировавшейся в результате осеннего закаливания, но и сохранившейся после оттепелей морозоустойчивостью и способностью адаптироваться к повторяющимся заморозкам.

Процесс раззакаливания растений изучен недостаточно, однако, в целом, он представляет собой процесс противоположный процессу закаливания (Kalberer et al., 2006). Раззакаливание становится необратимым при резком повышении температуры окружающей среды, когда растения трогаются в рост, и носит обратимый характер при постепенном снижении температуры (при условии, что растения ещё не перешли к активной вегетации) (Чиркова, 2002; Rapacz, 2002; Kalberer et al., 2006). Вероятно, если затормозить переход к активной вегетации при резком временном повышении температуры окружающей среды, можно защитить растения от их гибели при последующих заморозках. Поэтому в районах с неустойчивой погодой в период поздней зимы и ранней весны будет целесообразней возделывать сорта с более длительным периодом покоя и поздним сроком запуска раззакаливания.

Известно, что регуляторы роста (как природные, так и синтетические) оказывают влияние на морозостойкость растений, регулируя продолжительность покоя (удлиняя его). На основании этих данных было предположено, что для повышения морозоустойчивости растений в ранневесенний период могут быть

эффективны регуляторы роста растений, обладающие ретардантными свойствами. Как показал анализ данных, имеющихся в литературе, такими свойствами обладают фунгициды триазольной природы (Прусакова и Чижова, 1998). Это большая группа соединений, которые широко используются в сельском хозяйстве в качестве системных фунгицидов профилактического и лечебного действия. Имеются сведения о способности ряда фунгицидов триазольной природы повышать устойчивость растений к стрессовым факторам, в том числе температурному (Прусакова и Чижова, 1998; Gilley and Fletcher, 1997). Механизмы повышения устойчивости при применении этих препаратов изучены недостаточно, предположительно они связаны с влиянием триазолов на синтез основного стрессового гормона растений – АБК (Павлова, 2003; Чижова и др., 2005). Как известно, повышение содержания АБК является необходимым звеном механизма низкотемпературной адаптации, поскольку приводит к АБК-зависимому синтезу белков (Шакирова и др., 2009; Таланова и др., 2011; Титов и Таланова, 2011; Theocharis et al., 2012) и накоплению сахаров (Kerepesi et al., 2004; Liu et al., 2013). Кроме того, триазолы являются ингибиторами синтеза стерина, в том числе у растений (Попов и др., 2003; Benton and Cobb, 1997). Снижение содержания стерина в мембранах растительных клеток, в свою очередь может приводить к повышению их текучести, что снижает температуру фазового перехода липидов и позволяет поддерживать работу локализованных в мембранах ферментов при гипотермии (Хочачка и Сомеро, 1988). Поскольку производные триазола могут приводить к увеличению содержания АБК, от которой зависит синтез стрессовых белков, накопление водорастворимых углеводов и десатурация НЖК мембранных липидов, то обработка триазолами, возможно, приведёт к повышению морозоустойчивости растений и к поддержанию свойств морозоустойчивости в период раззакаливания.

Для проверки выдвинутой нами гипотезы использовали тебуконазол-содержащий протравитель семян (содержание тебуконазола 60 г/л) – системный фунгицид профилактического и лечебного действия. Данный препарат активно применяется в сельском хозяйстве для протравливания семян зерновых культур

для борьбы с болезнями растений, вызываемых базидиомицетами, аскомицетами и некоторыми дейтеромицетами (Попов и др., 2003). Протравитель удобен в использовании. В отличие от других препаратов, содержащих несколько действующих веществ одного или разных классов пестицидов, протравитель «Бункер» содержит только одно действующее вещество – тебуконазол. Отсутствие в составе препарата других действующих веществ облегчает объяснение механизма действия препарата на растения.

В качестве объектов исследования использовали яровую пшеницу, озимую пшеницу и озимую рожь. Озимая рожь в этом ряду является наиболее морозо- и зимостойкой, озимая пшеница занимает второе место, а яровая пшеница обладает лишь холодоустойчивостью, то есть погибает при отрицательных температурах.

В лабораторных условиях с использованием этиолированных проростков яровой пшеницы, озимой пшеницы и озимой ржи подтвердилось, что обработка семян тебуконазол-содержащим протравителем приводит к повышению холодо- и морозоустойчивости яровой и озимой пшеницы за счёт влияния препарата на ростовые процессы проростков, углеводный, белковый, жирнокислотный и дыхательный метаболизмы.

Обработка семян злаков протравителем в разной концентрации (от 0,5 до 5 мкл/г семян) оказывала ростингибирующий эффект, который имел явный концентрационно-зависимый характер. При этом наиболее эффективно препарат ингибировал рост coleoptилей яровой и озимой пшеницы, на озимой ржи данный эффект протравителя был менее выражен (см. 3.1.1, рис. 9). Кроме того, было показано, что тебуконазол-содержащий протравитель оказывает более сильный ростингибирующий эффект, нежели синтетический препарат тебуконазол (см. 3.1.1, рис. 11).

Тебуконазол-содержащий препарат не оказывал фитотоксичного действия на клетки coleoptилей исследуемых злаков (Korsukova et al., 2015). Более того, восстановительная активность клеток coleoptилей проростков злаков из обработанных протравителем семян повышалась и имела положительный

концентрационно-зависимый характер (см. 3.1.2, рис. 12). Это связано, скорее всего, с тем, что тебуконазол снижает скорость потребления НАД·Н клетками колеоптилей из-за угнетения дыхания (см. 3.4.1), что приводит к увеличению восстановительной активности клеток. Кроме того, повышенная восстановительная активность клеток свидетельствует об их более высокой жизнеспособности. По-видимому, увеличение числа живых клеток в колеоптилях проростков из обработанных семян было связано со сдвигом сроков наступления ПКГ, которая в естественных условиях старения колеоптиля начинается на 5-6-е сутки (см. 3.1.2, рис. 13, 14). Можно предполагать, что тебуконазол-содержащий препарат, являясь ретардантом, затормозил рост и старение проростков, что согласуется с данными, имеющимися в литературе, о влиянии ретардантов на растения (Прусакова и Чижова, 1998; Павлова, 2003).

Обработка семян исследуемых злаков тебуконазол-содержащим препаратом приводила к увеличению степени ненасыщенности жирных кислот побегов этиолированных проростков злаков (см. 3.2.1). Причём повышение степени ненасыщенности жирных кислот наблюдалось даже у незакалённых к холоду проростков исследуемых злаков из обработанных семян (см. 3.2.1, табл. 1, 2 и 3). Закалённые к холоду проростки озимой пшеницы и ржи из обработанных семян характеризовались более высоким уровнем ненасыщенности жирных кислот по сравнению с закалёнными растениями из необработанных семян (см. 3.2.1, табл. 2 и 3). Наиболее значительно препарат влиял на яровую и озимую пшеницу (см. 3.2.1, табл. 1 и 2). Так, показатели ненасыщенности жирных кислот холодозакалённых проростков озимой пшеницы из обработанных семян приближались к показателям степени ненасыщенности холодозакалённой озимой ржи (см. 3.2.1, табл. 2 и 3).

Увеличение степени ненасыщенности жирных кислот происходило за счёт снижения содержания НЖК и увеличения ННЖК и ПНЖК, главным образом происходило снижение содержания пальмитиновой кислоты и повышение содержания α -линоленовой кислоты. Как известно, повышенное содержание α -линоленовой кислоты является маркером криорезистентности растительных

клеток (Верещагин, 2007). Этот факт подтверждается и нашими данными, свидетельствующими о том, что содержание α -линоленовой кислоты возрастает в ряду: яровая пшеница – озимая пшеница – озимая рожь, также, как и возрастает устойчивость данных злаков к низким температурам (см. 3.3, табл. 4).

Важную роль в механизмах низкотемпературной адаптации играют стрессовые белки дегидрины, синтез ряда которых носит АБК-зависимый характер (Аллагулова и др., 2003; Thomashow, 1999; Rorat, 2006; Hanin et al., 2011). Повышение морозоустойчивости исследуемых злаков сопровождалось синтезом дегидринов (см. 3.2.2). При этом обработка тебуконазол-содержащим протравителем семян индуцировала в побегах яровой и озимой пшеницы синтез новых дегидринов с молекулярными массами 19, 27, 28,5 кДа и 18,6, 19, 21, 22, 25 кДа, соответственно (см. 3.2.2, рис. 15, 16). При закаливании яровой и озимой пшеницы из обработанных семян наблюдали значительное повышение содержания полипептида с молекулярной массой 27 кДа (Корсукова и др., 2015; Korsukova et al., 2015). Этот же полипептид детектировался и после раззакаливания данных злаков. Обработка тебуконазол-содержащим препаратом семян озимой ржи не приводила к синтезу новых дегидринов после закаливания растений, однако у растений из обработанных семян после раззакаливания продолжали детектироваться полипептиды с молекулярными массами 16 и 23 кДа (см. 3.2.2, рис. 17).

Обнаруженные после обработки препаратом низкомолекулярные дегидрины, скорее всего, участвуют в повышении морозоустойчивости, поскольку обработка семян тебуконазол-содержащим препаратом увеличивала выживаемость проростков злаков после действия отрицательных температур (см. 3.3, табл. 4). Следует отметить, что спектр дегидринов у морозоустойчивой озимой пшеницы (даже у растений из необработанных семян) был разнообразнее спектра дегидринов холодоустойчивой яровой пшеницы (как у контрольных растений, так и у растений из обработанных семян).

Накопление сахаров является необходимым условием роста устойчивости растений к отрицательной температуре, поскольку сахара выступают в роли

криопротекторов растительных клеток и выполняют другие функции при низкотемпературной адаптации растений (Трунова, 2007; Косулина и др., 2011). Также имеются данные, подтверждающие наличие в растительных клетках сахарозо-зависимой индукции синтеза дегидринов (Боровик, 2015).

В исследованиях наблюдалась положительная связь между содержанием водорастворимых углеводов в тканях исследуемых злаков и их морозоустойчивостью. Содержание сахаров также, как и содержание α -линоленовой кислоты, повышалось в ряду: яровая пшеница – озимая пшеница – озимая рожь (см. 3.2.3). Обработка семян тебуконазол-содержащим протравителем вызывала повышение содержания сахаров у исследуемых злаков, как при нормальных температурных условиях, так и при холодовом закаливании и раззакаливании растений, что наиболее явно было выражено на проростках озимой пшеницы (см. 3.2.3, рис. 19). В процессе роста исследуемых злаков наблюдалось более экономное расходование сахаров проростками, выращенными из обработанных протравителем семян (см. 3.2.3, рис. 18, 19, 20).

Можно предположить, что повышенное содержание сахаров в тканях побегов проростков, выращенных из обработанных протравителем семян, связано как с торможением ростовых процессов (см. 3.1.1, рис. 9), так и поддержанием интенсивности дыхания тканей побегов при раззакаливании на уровне дыхания закалённых растений (см. 3.2.4, рис. 22). Дыхание проростков озимой пшеницы из обработанных семян при закаливании и последующем раззакаливании сохранялось на уровне дыхания закалённых растений (см. 3.2.4, рис. 22), тогда как у растений из необработанных семян (контрольные растения) дыхание резко возрастало при раззакаливании (см. 3.2.4, рис. 21). Данная активация дыхания при раззакаливании контрольных растений, возможно, была одной из причин снижения морозоустойчивости (см. 3.3, табл. 5). Резкое увеличение интенсивности дыхания у растений озимой пшеницы в естественных условиях, например при наступлении оттепелей (Поморцев, 2013; Поморцев и др., 2013), вероятно, приводит к быстрому раззакаливанию растений, что

является одной из главных причин их гибели в ранний весенний период при возвращении отрицательных температур (Дорофеев и др., 2004).

Фунгициды, в том числе триазольной природы, являются ингибиторами митохондриального дыхания и их действие направлено на комплекс I дыхательной цепи митохондрий (Сафина-Осташевская и Гордон, 1984). Это также подтвердилось в наших экспериментах, тебуконазол значительно снижал окислительную активность митохондрий озимой (см. 3.4.1, табл. 6) и яровой (см. 3.4.1, рис. 24) пшеницы только при окислении малата. При этом наблюдался его явный концентрационно-зависимый эффект (см. 3.4.1, рис. 24а). На изолированных митохондриях озимой пшеницы было выявлено, что тебуконазол влияет на цитохромный путь переноса электронов, подавляя его при окислении малата и в меньшей степени – сукцината. Но при этом тебуконазол не влияет на альтернативный путь дыхания (см. 3.4.1, рис. 23). Ингибирование скорости дыхания митохондрий наблюдали и после обработки семян тебуконазол-содержащим протравителем, однако в этом случае действие препарата было направлено в целом на скорость переноса электронов по ЭТЦ, поскольку не было обнаружено явных различий в скоростях окисления используемых субстратов (см. 3.4.1, табл. 6). Тебуконазол-содержащий протравитель подавлял как цитохромный, так и альтернативный путь переноса электронов в митохондриях (см. 3.4.1, рис. 23). Возможно, это объясняется присутствием в промышленном препарате дополнительных веществ, таких как красители, прилипатели, загустители и др. Тебуконазол приводил к некоторому усилению окислительной и фосфорилирующей активности митохондрий из холодозакалённых растений (см. 3.4.2, табл. 7), что может объясняться необходимостью такого уровня дыхания для обеспечения синтетических процессов в клетке при закаливании растений. Усиление дыхания митохондрий происходило за счёт увеличения вклада альтернативного пути переноса электронов, связанного с функционированием АО, главным образом, при окислении малата (см. 3.4.2, рис. 25). АО, как известно, принимает участие в адаптации растений к низким температурам (Грабельных и др., 2014б).

Исходя из имеющихся в литературе данных и полученных в работе результатов, можно предположить следующую цепь событий, происходящих в клетках злаков при обработке тебуконазолом (рис. 26).

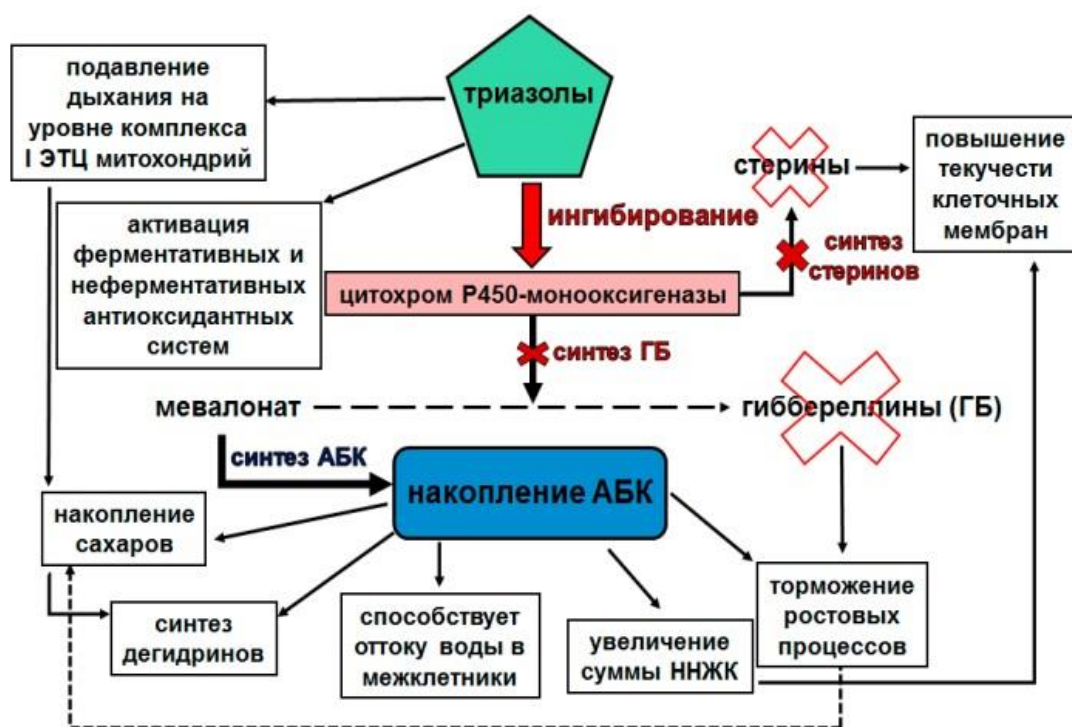


Рис. 26. Гипотетическая схема участия триазолов в повышении морозоустойчивости злаков

Обозначения: АБК – абсцизовая кислота, ГБ – гиббереллины, ННЖК – ненасыщенные жирные кислоты, ЭТЦ – электрон-транспортная цепь.

Тебуконазол, являясь производным 1,2,4-триазола, действует на уровне фермента цитохром Р450-монооксигеназы, катализирующего синтез ГК₁₂ (общего предшественника других ГБ) из энт-каурена. Ингибирование данного фермента приводит к подавлению синтеза ГБ и переключению метаболического изопреноидного пути на синтез АБК из мевалоновой кислоты (общего предшественника для синтеза ГБ и АБК) (Vettakkorumakankav et al., 1999). Подавление синтеза ГБ и увеличение содержания АБК приводят к торможению ростовых процессов осевых органов растений (Касперска-Палач, 1983; Лукаткин, 2002; Трунова, 2007; Кузнецов и Дмитриева, 2011; Титов и Таланова, 2011). Накопление АБК – основного стрессового гормона растений – запускает синтез стрессовых белков, в том числе АБК-зависимых дегидринов (Шакирова и

др., 2009; Таланова и др., 2011; Титов и Таланова, 2011; Theocharis et al., 2012), и накопление водорастворимых углеводов (Kerepesi et al., 2004; Liu et al., 2013), которые в свою очередь также могут усиливать синтез дегидринов (Боровик, 2015). Увеличение содержания АБК может вызывать усиление активности десатураз, что приведёт к увеличению содержания ПНЖК (Bakht et al., 2006). Являясь ингибитором синтеза стерина (Попов и др., 2003; Naughtan et al., 1988; Benton and Cobb, 1997), тебуконазол повышает текучесть клеточных мембран, в первую очередь плазмалеммы. Тебуконазол подавляет цитохромный путь дыхания на уровне комплекса I дыхательной цепи митохондрий, снижение дыхания позволяет экономить субстраты – водорастворимые углеводы. При этом транспорт электронов по альтернативному пути через АО не ингибируется, что может быть важным для предотвращения окислительного стресса в митохондриях при низкой температуре (Грабельных и др., 2011). Тебуконазол также может приводить к снижению АФК, образующихся при низкотемпературном стрессе, за счёт активации других ферментативных и неферментативных антиоксидантных систем (Kraus and Fletcher, 1994). Все рассмотренные механизмы направлены на повышение устойчивости растительной клетки и растения в целом к отрицательной температуре. Повышенное содержание водорастворимых углеводов, дегидринов, ПНЖК, более поздняя активация дыхания позволяют дольше сохранять свойства морозоустойчивости, в том числе при временном повышении температуры с последующим заморозком. Особенно такая обработка актуальна для озимой пшеницы в условиях резко-континентального климата Восточной Сибири.

Таким образом, полученные нами данные расширяют перспективы для выращивания озимой пшеницы в регионах с нестабильным температурным режимом в позднезимний и ранневесенний периоды. Перспективы дальнейших исследований видятся в подтверждении результатов лабораторных исследований в полевых условиях и точном установлении определяющего фактора развития устойчивости растений к отрицательным температурам под действием фунгицидов на основе тебуконазола.

ВЫВОДЫ

1) Тебуконазол-содержащий протравитель (содержание тебуконазола 60 г/л) в концентрациях от 0,5 до 5 мкл/г семян проявляет ростингибирующее действие и не оказывает фитотоксичного эффекта на клетки озимых и яровых злаков. Ингибирование роста проростков пшеницы сопровождается повышением холодо- и морозоустойчивости.

2) Тебуконазол-содержащий протравитель (в концентрации 1,5 мкл/г семян) приводит к повышению ненасыщенности жирных кислот в тканях побегов озимых и яровых злаков, обусловленному снижением содержания насыщенной пальмитиновой кислоты и увеличением содержания полиненасыщенной α -линоленовой кислоты.

3) У озимой и яровой пшеницы обработка семян тебуконазол-содержащим протравителем (в концентрации 1,5 мкл/г семян) сопровождается синтезом низкомолекулярных дегидринов (особенно с молекулярной массой 27 кДа) в тканях побегов при холодовом закаливании.

4) Тебуконазол-содержащий протравитель (в концентрации 1,5 мкл/г семян) влияет на углеводный метаболизм в тканях злаков, поддерживая содержание водорастворимых углеводов на более высоком уровне в оптимальных условиях роста и после закаливания, а у пшеницы – и после раззакаливания.

5) Тебуконазол влияет на дыхательный метаболизм митохондрий озимой пшеницы, ингибируя транспорт электронов через комплекс I дыхательной цепи в оптимальных для роста условиях. Снижение скорости дыхания митохондрий до закаливания приводит к снижению расходования субстратов. При холодовом закаливании озимой пшеницы реализуется другой механизм действия тебуконазола, направленный на поддержание скоростей дыхания митохондрий и активацию альтернативного пути, связанного с функционированием альтернативной цианид-резистентной оксидазы, которая играет важную роль при адаптации растений к холоду.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдрахимова Й.Р. Особенности дыхания и морфологии митохондрий узлов кущения озимой пшеницы при действии низких температур и картолина / Й.Р. Абдрахимова, Л.П. Хохлова, Ф.А. Абдрахимов // Физиол. раст. – 1998. – Т. 45, № 2. – С. 253–261.
2. Александров В.Я. Упрощенный способ инфильтрации растительных тканей / В.Я. Александров // Ботанич. журнал. – 1954. – Т. 39, № 3. – С. 421–422.
3. Аллагулова Ч.Р. Дегидрины растений: их структура и предполагаемые функции / Ч.Р. Аллагулова, Ф.Р. Гималов, Ф.М. Шакирова [и др.] // Биохимия. – 2003. – Т. 68, № 9. – С. 1157–1165.
4. Асахина Е. Процессы замерзания и повреждения растительных клеток // Холодостойкость растений / Пер. с англ. Г.Н. Зверевой, М.М. Тюриной; Под ред. и с предисл. Г.А. Самыгина. – М. : Колос, 1983. – 318 с. Библиогр.: с. 23–36.
5. Астахова Н.В. Влияние гена *desA* Δ 12-ацил-липидной десатуразы на структуру хлоропластов и устойчивость к гипотермии растений картофеля / Н.В. Астахова, И.Н. Дёмин, Н.В. Нарайкина [и др.] // Физиол. раст. – 2011. – Т. 58, № 1. – С. 21–27.
6. Астахова Н.В. Реорганизация ультраструктуры хлоропластов при низкотемпературном закаливании растений арабидопсиса / Н.В. Астахова, В.Н. Попов, А.А. Селиванов [и др.] // Физиол. раст. – 2014. – Т. 61, № 6. – С. 790–797.
7. Барышева Т.С. Влияние циклогексимида на синтез полисахаридов клеточной стенки и активность гликозидаз корней пшеницы при закаливании к морозу / Т.С. Барышева, О.А. Заботина, А.И. Заботин // Физиол. раст. – 1999. – Т. 46, № 4. – С. 633–638.
8. Боровик О.А. Связь между активностью альтернативного пути дыхания, содержанием сахаров и морозоустойчивостью озимой пшеницы / О.А. Боровик, О.И. Грабельных, Н.А. Королева [и др.] // Журнал Стресс-физиологии и биохимии. – 2013. – Т. 9, № 4. – С. 241–250.

9. Боровик О.А. Влияние углеводного статуса и низкой температуры на дыхательный метаболизм митохондрий из этиолированных листьев озимой пшеницы / О.А. Боровик, О.И. Грабельных, Н.А. Королева [и др.] // Журнал Стресс-физиологии и биохимии. – 2014. – Т. 10, № 4. – С. 118–130.
10. Боровик О.А. Функционирование альтернативной оксидазы и НАД(Ф)-Н-дегидрогеназ II типа в митохондриях из этиолированных и зеленых побегов озимой пшеницы при холодовом закаливании : Дис. ... канд. биол. наук : 03.01.05 / О.А. Боровик. – Иркутск, 2015. – 178 с.
11. Браун Г.Н. Механизм белкового синтеза в связи с морозостойкостью растений // Холодостойкость растений / Пер. с англ. Г.Н. Зверевой, М.М. Тюриной; Под ред. и с предисл. Г.А. Самыгина. – М. : Колос, 1983. – 318 с. Библиогр.: с. 124–131.
12. Бровкин В.И. Как повысить урожай озимой пшеницы / В.И. Бровкин, С.Ф. Соколенко // Защита и карантин растений. – 2010. – № 11. – С. 20–22.
13. Бубякина В.В. Особенности сезонной динамики дегидринов *Betula platyphylla* Sukacz., ассоциированные с формированием морозоустойчивости в условиях криолитозоны / В.В. Бубякина, Т.Д. Татарина, А.Г. Пономарев [и др.] // Доклады Академии наук. – 2011. – Т. 439, № 6. – С. 844–847.
14. Ванюшин Б.Ф. Апоптоз у растений / Б.Ф. Ванюшин // Успехи биологической химии. – 2001. – Т. 41. – С. 3–38.
15. Верещагин А.Г. Липиды в жизни растений : доложено на шестьдесят шестом ежегодном Тимирязевском чтении 5 июня 2005 г. / А.Г. Верещагин. – М. : Наука, 2007. – 76 с. : ил.
16. Вовчук С.В. Активность пептидгидролаз в проростках озимой пшеницы при действии низких температур / С.В. Вовчук, В.Н. Мусич, О.А. Макаренко // Физиол. и биохим. культурн. раст. – 1991. – Т. 23, № 4. – С. 355–359.
17. Вовчук С.В. Протеиназная активность и компонентный состав межклеточной жидкости проростков озимой пшеницы при действии низких

температур / С.В. Вовчук, О.А. Макаренко, В.Н. Мусич // Физиол. и биохим. культурн. раст. – 1994. – Т. 26, № 2. – С. 180–185.

18. Войников В.К. К вопросу о выделении интактных растительных митохондрий / В.К. Войников // Известия Сиб. отд-ния АН СССР. Сер. биол. наук. – 1980. – Т. 10, вып. 2. – С. 121–125.

19. Войников В.К. Температурный стресс и митохондрии растений / В.К. Войников; Отв. ред. Р.К. Салаяев; АН СССР, Сиб. отд-ние, Сиб. ин-т физиологии и биохимии растений. – Новосибирск : Наука : Сиб. отд-ние, 1987. – 133 с. : ил.

20. Войников В.К. Энергетическая и информационная системы растительных клеток при гипотермии / В.К. Войников; Отв. ред. чл.-корр. РАН Р.К. Салаяев; Рос. акад. наук, Сиб. отд-ние, Сиб. ин-т физиологии и биохимии растений. – Новосибирск : Наука, 2013. – 212 с. : ил., табл.

21. Гамбург К.З. Взаимосвязь различий в устойчивости к заморозкам арабидопсиса и теллунгииеллы с содержанием белков теплового шока и дегидринов / К.З. Гамбург, Н.Е. Коротаева, Б.К. Бадурев [и др.] // Физиол. раст. – 2014. – Т. 61, № 3. – С. 343–349.

22. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц; Пер. с англ. д-ра физ.-мат. наук Ю.А. Данилова; Под ред. Н.Е. Бузикашвили и Д.В. Самойлова. – М. : Практика, 1999. – 459 с. : ил., табл.

23. Головки Т.К. Дыхание растений (физиологические аспекты) / Т.К. Головки. – СПб. : Наука, 1999. – 204 с.

24. Грабельных О.И. Антиоксидантная функция альтернативной оксидазы в митохондриях озимой пшеницы при холодовом закаливании / О.И. Грабельных, Т.П. Побежимова, Н.С. Павловская [и др.] // Биол. мембраны. – 2011. – Т. 28, № 4. – С. 274–283.

25. Грабельных О.И. Влияние холодового шока на жирнокислотный состав и функциональное состояние митохондрий закаленных и незакаленных проростков озимой пшеницы / О.И. Грабельных, К.А. Кириченко, Т.П. Побежимова [и др.] // Биол. мембраны. – 2014а. – Т. 31, № 3. – С. 204–217.

26. Грабельных О.И. Митохондриальные энергорассеивающие системы (альтернативная оксидаза, разобщающие белки и «внешняя» NADH-дегидрогеназа) вовлечены в развитие морозоустойчивости проростков озимой пшеницы / О.И. Грабельных, О.А. Боровик, Е.Л. Таусон [и др.] // Биохимия. – 2014б. – Т. 79, № 6. – С. 645–660.
27. Гришечкина Л.Д. Препараты на основе флудиоксонила для защиты пшеницы яровой от семенной и почвенной инфекции / Л.Д. Гришечкина, В.И. Долженко, А.И. Силаев [и др.] // Вестник защиты растений. – 2015. – Т. 1, № 83. – С. 31–35.
28. Дёмин И.Н. Влияние трансформации растений картофеля геном $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы на CO_2 -газообмен и активность антиоксидантных ферментов при гипотермии / И.Н. Дёмин, Н.В. Нарайкина, В.Д. Цыдендамбаев [и др.] // Физиол. раст. – 2013. – Т. 60, № 3. – С. 377–385.
29. Дерябин А.Н. Устойчивость к гипотермии растений картофеля, трансформированных геном дрожжевой инвертазы, находящимся под контролем промотора пататина *B33* / А.Н. Дерябин, Т.И. Трунова, И.М. Дубинина [и др.] // Физиол. раст. – 2003. – Т. 50, № 4. – С. 505–510.
30. Дерябин А.Н. Экзогенная регуляция клубнеобразования у *Solanum tuberosum* L. в культуре *in vitro* (обзор) / А.Н. Дерябин, Н.О. Юрьева // С.-х. биол. – 2010. – № 3. – С. 17–25.
31. Дитченко Т.И. Молекулярные механизмы мембранотропного действия производных 1,2,4-триазола / Т.И. Дитченко, В.М. Юрин, В.П. Голубович [и др.] // Ученые записки. – 2002. – № 4. – С. 11–17.
32. Дише З. Общие цветные реакции // Методы химии углеводов / Пер. с англ.; Под ред. чл.-корр. АН СССР Н.К. Кочеткова. – М. : Мир, 1967. – 512 с. : ил. Библиогр.: с. 21–24.
33. Дмитриева В.Л. Изучение состава эфирных масел эфиромасличных растений нечернозёмной зоны России / В.Л. Дмитриева, Л.Б. Дмитриев // Известия ТСХА. – 2011. – № 3. – С. 106–119.

34. Дорофеев Н.В. Озимая пшеница в Иркутской области / Н.В. Дорофеев, А.А. Пешкова, В.К. Войников; СИФИБР СО РАН; Отв. ред. д.б.н., проф. О.П. Родченко. – Иркутск : Арт-Пресс, 2004. – 175 с.
35. Досон Р. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот [и др.]; Пер с англ. – М. : Мир, 1991. – 544 с. : ил.
36. Еникеев А.Г. Об использовании 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида для оценки жизнеспособности культур растительных клеток / А.Г. Еникеев, Е.Ф. Высоцкая, Л.А. Леонова [и др.] // Физиол. раст. – 1995. – Т. 42, № 3. – С. 423–426.
37. Жигачёва И.В. Жирнокислотный состав мембран митохондрий проростков гороха в условиях недостатка увлажнения и умеренного охлаждения / И.В. Жигачёва, Т.А. Мишарина, М.Б. Теренина [и др.] // Доклады Академии наук. – 2011. – Т. 437, № 4. – С. 558–560.
38. Жиров В.К. Перекисное окисление мембранных липидов холодостойких растений при повреждении отрицательными температурами / В.К. Жиров, М.Н. Мерзляк, Л.В. Кузнецов // Физиол. раст. – 1982. – Т. 29, № 6. – С. 1045–1052.
39. Зауралов О.А. Последствие пониженных температур на дыхание теплолюбивых растений / О.А. Зауралов, А.С. Лукаткин // Физиол. раст. – 1997. – Т. 44, № 5. – С. 736–741.
40. Иванов В.Б. Клеточные основы роста растений / В.Б. Иванов. – М. : Наука, 1974. – 223 с.
41. Иванова Т.И. Годичный цикл дыхания листьев вечнозеленых растений / Т.И. Иванова, О.В. Кирпичникова, О.А. Шерстнева [и др.] // Физиол. раст. – 1998. – Т. 45, № 6. – С. 906–913.
42. Йошида С. Распад фосфолипидов при замерзании растительных клеток // Холодостойкость растений / Пер. с англ. Г.Н. Зверевой, М.М. Тюриной; Под ред. и с предисл. Г.А. Самыгина. – М. : Колос, 1983. – 318 с. Библиогр.: с. 97–111.

43. Касперска-Палач А. Механизм закаливания травянистых растений // Холодостойкость растений / Пер. с англ. Г.Н. Зверевой, М.М. Тюриной; Под ред. и с предисл. Г.А. Самыгина. – М. : Колос, 1983. – 318 с. Библиогр.: с. 112–123.
44. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов / М. Кейтс. – М. : Мир, 1975. – 233 с.
45. Кефели В.И. Природные ингибиторы роста / В.И. Кефели // Физиол. раст. – 1997. – Т. 44, № 3. – С. 471–480.
46. Кислюк И.М. Стимуляция дыхания листьев пшеницы и пролиферация митохондрий в их клетках под влиянием охлаждения / И.М. Кислюк, Е.А. Мирославов, Т.В. Палеева // Физиол. раст. – 1995. – Т. 42, № 4. – С. 603–606.
47. Климов С.В. О причинах различий в морозостойкости озимой ржи и пшеницы. 2. Влияние холодового закаливания на ультраструктуру хлоропластов, фотосинтез, белковый, липидный и жирнокислотный состав первого листа / С.В. Климов, С.В. Давыденко, Г.В. Новицкая [и др.] // Физиол. раст. – 1993. – Т. 40, № 4. – С. 627–635.
48. Климов С.В. Повышенное отношение фотосинтез/дыхание при низких температурах – важное условие холодового закаливания озимой пшеницы / С.В. Климов // Физиол. раст. – 1998. – Т. 45, № 3. – С. 419–424.
49. Климов С.В. Пути адаптации растений к низким температурам / С.В. Климов // Успехи современной биологии. – 2001. – Т. 121, № 1. – С. 3–22.
50. Климов С.В. Связь CO_2 -газообмена с накоплением сахаров и активностью инвертаз при холодовом закаливании озимой пшеницы / С.В. Климов, И.М. Дубинина, Е.А. Бураханова [и др.] // Доклады Академии наук. – 2004. – Т. 398, № 1. – С. 135–138.
51. Климов С.В. Способность растений озимой пшеницы закаливаться к морозу связана с особенностями CO_2 -газообмена, синтезом биомассы и различных форм водорастворимых углеводов / С.В. Климов, Е.А. Бураханова, Г.П. Алиева [и др.] // Известия РАН. Серия биологическая. – 2010. – № 2. – С. 210–216.

52. Климова Е.В. Влияние минеральных удобрений на эффективность пестицидов и ретардантов, применяемых на посевах зерновых колосовых культур / Е.В. Климова // Экологическая безопасность в АПК. Реферативный журнал. – 2002. – № 3. – С. 662.

53. Колесниченко А.В. Белки низкотемпературного стресса растений / А.В. Колесниченко, В.К. Войников; Отв. ред. д.б.н., проф. В.К. Войников; Сиб. ин-т физиологии и биохимии растений Сиб. отд-ния Рос. акад. наук. – Иркутск : Арт-Пресс, 2003. – 196 с. : ил.

54. Колупаев Ю.Е. Особенности метаболизма и защитные функции углеводов растений в условиях стрессов / Ю.Е. Колупаев, Т.И. Трунова // Физиол. и биохим. культурн. раст. – 1992. – Т. 24, № 6. – С. 523–533.

55. Колупаев Ю.Е. Активность инвертазы и содержание углеводов в колеоптилях пшеницы при гипотермическом и солевом стрессах / Ю.Е. Колупаев, Т.И. Трунова // Физиол. раст. – 1994. – Т. 41, № 4. – С. 552–557.

56. Колупаев Ю.Е. Активность антиоксидантных ферментов и содержание осмолитов в проростках озимых злаков при закаливании и криострессе / Ю.Е. Колупаев, Н.И. Рябчун, А.А. Вайнер [и др.] // Физиол. раст. – 2015. – Т. 62, № 4. – С. 533–541.

57. Корсукова А.В. Роль активных форм кислорода и участие митохондрий в развитии программируемой клеточной гибели в колеоптилях озимой пшеницы / А.В. Корсукова, О.И. Грабельных, И.В. Любушкина [и др.] // Известия Иркутского государственного университета. Серия «Биология. Экология». – 2013а. – Т. 6, № 2. – С. 14–26.

58. Корсукова А.В. Холодовое закаливание предотвращает индуцированную перекисью водорода программируемую клеточную гибель в колеоптилях кукурузы / А.В. Корсукова, О.И. Грабельных, Т.П. Побежимова [и др.] // Журнал Стресс-физиологии и биохимии. – 2013б. – Т. 9, № 1. – С. 246–257.

59. Корсукова А.В. Повышение холодостойкости проростков яровой пшеницы при обработке семян тебуконазолом / А.В. Корсукова, О.А. Боровик,

О.И. Грабельных [и др.] // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2015, № 4 (15). – С. 30–36.

60. Косулина Л.Г. Физиология устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды : Учебное пособие / Л.Г. Косулина, Э.К. Луценко, В.А. Аксенова. – Ростов н/Д : Изд-во Рост. ун-та, 2011. – 236 с.

61. Кошкин Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур : Учебник / Е.И. Кошкин. – М. : Дрофа, 2010. – 638 с. : ил.

62. Красавцев О.А. Калориметрия растений при температурах ниже нуля / О.А. Красавцев; АН СССР. Ин-т физиологии растений им. К.А. Тимирязева. – М. : Наука, 1972. – 117 с. : ил.

63. Красавцев О.А. Свойства плазмалеммы морозостойких растительных клеток / О.А. Красавцев // Успехи современной биологии. – 1988. – Т. 106, № 1 (4). – С. 143–157.

64. Кузнецов Вл.В. Физиология растений : Учебник / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М. : Абрис, 2011. – 783 с. : ил.

65. Курьята В.Г. Влияние хлормекватхлорида на формирование фотосинтетического аппарата и продуктивность льна масличного в условиях Правобережной лесостепи Украины / В.Г. Курьята, Е.А. Ходаницкая // Зернобобовые и крупяные культуры. – 2013. – № 4 (8). – С. 88–93.

66. Левитт Дж. Повреждения и выживание после замораживания и связь с другими повреждающими воздействиями // Холодостойкость растений / Пер. с англ. Г.Н. Зверевой, М.М. Тюриной; Под ред. и с предисл. Г.А. Самыгина. – М. : Колос, 1983. – 318 с. Библиогр.: с. 10–22.

67. Ли П.Х. Морозостойкость клубненосных видов *Solanum* и действие на них замораживания // Холодостойкость растений / П.Х. Ли, Дж.П. Палта; Пер. с англ. Г.Н. Зверевой, М.М. Тюриной; Под ред. и с предисл. Г.А. Самыгина. – М. : Колос, 1983. – 318 с. Библиогр.: с. 46–63.

68. Лось Д.А. Десатуразы жирных кислот: адаптивная экспрессия и принципы регуляции / Д.А. Лось // Физиол. раст. – 1997. – Т. 44, № 4. – С. 528–540.

69. Лось Д.А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот / Д.А. Лось // Успехи биологической химии. – 2001. – Т. 41. – С. 163–198.
70. Лось Д.А. Десатуразы жирных кислот / Д.А. Лось. – М. : Научный мир, 2014. – 372 с. : ил., портр., табл.
71. Лукаткин А.С. Изменения перекисного окисления липидов в листьях теплолюбивых растений при различной длительности холодового стресса / А.С. Лукаткин, Э.Ш. Шаркаева, О.А. Зауралов // Физиол. раст. – 1995. – Т. 42, № 4. – С. 607–611.
72. Лукаткин А.С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс / А.С. Лукаткин. – Саранск : Изд-во Мордов. ун-та, 2002. – 208 с.
73. Лэмб Ч.А. Физиология // Пшеница и ее улучшение / Пер. с англ. Н.А. Емельяновой, Н.М. Резниченко; Под ред. д-ра с.-х. наук М.М. Якубцинера [и др.]. – М. : Колос, 1970. – 519 с. : ил. Библиогр.: с. 199–249.
74. Макаренко С.П. Влияние низких температур на жирнокислотный состав контрастных по холодоустойчивости видов злаков / С.П. Макаренко, Л.В. Дударева, А.И. Катышев [и др.] // Биол. мембраны. – 2010. – Т. 27, № 6. – С. 482–488.
75. Максимов Н.А. Избранные работы по засухоустойчивости и зимостойкости растений. Т. 2: Зимостойкость растений / Н.А. Максимов; Отв. ред. проф. П.А. Генкель [и др.]. – М. : Изд-во АН СССР, 1952. – 294 с. : ил.
76. Марковская Е.Ф. Кратковременная гипотермия и растение / Е.Ф. Марковская, М.И. Сысоева, Е.Г. Шерудило; Отв. ред. Н.П. Чернобровкина. – Петрозаводск : Карельский научный центр РАН, 2013. – 194 с. : ил., табл.
77. Медведев С.С. Физиология растений : Учебник / С.С. Медведев. – СПб. : Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2004. – 336 с. : ил.
78. Меденцев А.Г. Регуляция и физиологическая роль цианидрезистентной оксидазы у грибов и растений / А.Г. Меденцев, А.Ю. Аринбасарова, В.К. Акименко // Биохимия. – 1999. – Т. 64, № 11. – С. 1457–1472.

79. Мельников Н.Н. Пестициды и регуляторы роста растений : Справочник / Н.Н. Мельников, К.В. Новожилов, С.Р. Белан. – М. : Химия, 1995. – 575 с. : ил.
80. Меняйло Л.Н. Роль фитогормонов в устойчивости древесных растений к стрессам / Л.Н. Меняйло // Успехи современной биологии. – 1992. – Т. 112, № 5–6. – С. 745–747.
81. Навашин П.С. Антифунгальная химиотерапия. Успехи и проблемы / П.С. Навашин // Антибиотики и химиотерапия. – 1998. – Т. 43, № 8. – С. 3–6.
82. Нарайкина Н.В. Изменения активности изоформ супероксиддисмутазы у растений картофеля дикого типа и трансформированных геном $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы при низкотемпературной адаптации / Н.В. Нарайкина, М.С. Синькевич, И.Н. Дёмин [и др.] // Физиол. раст. – 2014. – Т. 61, № 3. – С. 359–366.
83. Нарийчук Ф.Д. Изменение функциональной активности митохондрий проростков озимой пшеницы в процессе закаливания / Ф.Д. Нарийчук, В.И. Бабенко // Физиол. и биохим. культурн. раст. – 1981. – Т. 13, № 6. – С. 582–586.
84. Новицкая Г.В. Изменение ненасыщенности жирных кислот липидов растений озимой и яровой пшеницы в процессе закаливания / Г.В. Новицкая, Е.Б. Сальникова, Т.А. Суворова // Физиол. и биохим. культурн. раст. – 1990. – Т. 22, № 3. – С. 257–264.
85. Новицкая Г.В. Липидный состав листьев в связи с холодостойкостью растений томатов / Г.В. Новицкая, Т.А. Суворова, Т.И. Трунова // Физиол. раст. – 2000. – Т. 47, № 6. – С. 829–835.
86. Османьян Р.Г. Перераспределение питательных веществ в растении и повышение урожайности сахарной свеклы в результате обработки растений ретардантом Бетамилом. (Болгария) / Р.Г. Османьян // Экологическая безопасность в АПК. Реферативный журнал. – 2003. – № 2. – С. 347.
87. Павлова В.В. Действие триазолиевых соединений на содержание абсцизовой кислоты у растений ячменя / В.В. Павлова, С.И. Чижова, Л.Д.

Прусакова // III Межд. конф. «Регуляторы роста и развития растений» : материалы науч. конф. – М., 1995. – С. 72.

88. Павлова В.В. Влияние ретардантов триазолиевого ряда на содержание фитогормонов, рост и развитие ярового ячменя : Дис. ... канд. биол. наук : 03.00.12 / В.В. Павлова. – Москва, 2003. – 152 с.

89. Палта Дж.П. Свойства клеточных мембран в связи с повреждениями при замерзании // Холодостойкость растений / Дж.П. Палта, П.Х. Ли; Пер. с англ. Г.Н. Зверевой, М.М. Тюриной; Под ред. и с предисл. Г.А. Самыгина. – М. : Колос, 1983. – 318 с. Библиогр.: с. 79–96.

90. Петров К.А. Древесные растения Якутии и низкотемпературный стресс / К.А. Петров, В.Е. Софронова, В.В. Бубякина [и др.] // Физиол. раст. – 2011. – Т. 58, № 6. – С. 866–874.

91. Пиотровский М.С. Активация НАДФ·Н-оксидазы плазмалеммы при действии низких положительных температур на этиолированные проростки кукурузы / М.С. Пиотровский, Т.А. Шевырева, И.М. Жесткова [и др.] // Физиол. раст. – 2011. – Т. 58, № 2. – С. 234–242.

92. Побежимова Т.П. Методы изучения митохондрий растений. Полярография и электрофорез / Т.П. Побежимова, А.В. Колесниченко, О.И. Грабельных; Отв. ред. чл.-корр. РАН Р.К. Саляев. – М. : ООО «НПК ПРОМЭКОБЕЗОПАСНОСТЬ», 2004. – 98 с.

93. Полевой В.В. Физиология растений : Учеб. для биол. спец. вузов / В.В. Полевой. – М. : Высш. шк., 1989. – 464 с. : цв. ил.

94. Поморцев А.В. Связь морозостойкости озимых зерновых с интенсивностью дыхания и содержанием водорастворимых углеводов в течение осенне-весеннего периода / А.В. Поморцев, О.И. Грабельных, Н.В. Дорофеев [и др.] // Журнал Стресс-физиологии и биохимии. – 2013. – Т. 9, № 4. – С. 115–121.

95. Поморцев А.В. Физиологические и биохимические процессы, определяющие зимостойкость озимых зерновых культур в условиях Восточной Сибири : Дис. ... канд. биол. наук : 03.01.05 / А.В. Поморцев. – Иркутск, 2013. – 154 с.

96. Пономарев А.Г. Дегидрины, ассоциированные с формированием морозоустойчивости березы плосколистной / А.Г. Пономарев, Т.Д. Татарина, А.А. Перк [и др.] // Физиол. раст. – 2014. – Т. 61, № 1. – С. 114–120.

97. Попов В.Н. Влияние трансформации табака геном $\Delta 9$ -ацил-липидной десатуразы из *Synechococcus vulcanus* на устойчивость растений к низкой температуре / В.Н. Попов, И.В. Орлова, Н.В. Кипайкина [и др.] // Физиол. раст. – 2005. – Т. 52, № 5. – С. 747–750.

98. Попов В.Н. Активация генов, кодирующих белки несопряженного и разобщенного дыхания, в митохондриях томата при воздействии холода и активных форм кислорода / В.Н. Попов, А.Т. Епринцев, Е.В. Мальцева // Физиол. раст. – 2011. – Т. 58, № 5. – С. 758–765.

99. Попов В.Н. Изменения содержания и жирнокислотного состава липидов листьев и корней табака при низкотемпературном закаливании / В.Н. Попов, О.В. Антипина, В.П. Пчёлкин [и др.] // Физиол. раст. – 2012. – Т. 59, № 2. – С. 203–208.

100. Попов В.Н. Участие инвертазы клеточной стенки в низкотемпературном закаливании растений табака / В.Н. Попов, О.В. Антипина, Е.А. Бураханова // Физиол. раст. – 2013. – Т. 60, № 2. – С. 214–220.

101. Попов С.Я. Основы химической защиты растений : Учебное пособие / С.Я. Попов, Л.А. Дорожкина, В.А. Калинин; Под ред. проф. С.Я. Попова. – М. : Арт-Лион, 2003. – 208 с. : 3 табл., 4 ил.

102. Привалов Ф.И. Ретарданты в посевах ярового ячменя / Ф.И. Привалов // Защита и карантин растений. – 2012. – № 12. – С. 24–26.

103. Прищепа И.А. Влияние минеральных удобрений на эффективность пестицидов и ретардантов, применяемых на посевах зерновых колосовых культур / И.А. Прищепа // Вестник защиты растений. – 2000. – № 1. – С. 73–93.

104. Проценко Д.Ф. Физиология морозостойкости сортов озимых культур / Д.Ф. Проценко, О.И. Колоша. – Киев : Изд-во Киев. ун-та, 1969. – 259 с.

105. Прусакова Л.Д. Новые ретарданты и их физиологические свойства // Регуляторы роста и развития растений : материалы II Всесоюз. конф. по

регуляторам роста и развития растений, Киев, 25-27 мая 1988 г. / Отв. ред. Л.И. Мусатенко, В.И. Кефели. – Киев : Наук. думка, 1989. – 325 с. : ил. Библиогр.: с. 312.

106. Прусакова Л.Д. Синтетические регуляторы онтогенеза растений / Л.Д. Прусакова, С.И. Чинова // Итоги науки и техники. Сер.: Физиол. раст. Т. 7: Природные и синтетические регуляторы онтогенеза растений. – М. : ВИНТИ, 1990. – 158 с. Библиогр.: с. 84–124.

107. Прусакова Л.Д. Применение производных триазола в растениеводстве / Л.Д. Прусакова, С.И. Чинова // Агрохимия. – 1998. – № 10. – С. 37–44.

108. Пыйклик К.М. Накопление и расходование сахаров в связи с перезимовкой озимых / К.М. Пыйклик // Физиол. раст. – 1963. – Т. 10, № 2. – С. 130–136.

109. Рейтер А.Е. Влияние ретардантов на рост стебля и полегание растений озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) / А.Е. Рейтер // Известия КГТУ. – 2013. – № 31 (31). – С. 190–195.

110. Романенко А.С. Субклеточная локализация дегидринов в проростках растений озимой пшеницы при низкотемпературной адаптации / А.С. Романенко, Г.Б. Боровский, И.В. Уколова [и др.] // Биол. мембраны. – 2010. – Т. 27, № 2. – С. 156–165.

111. Роньжина Е.С. Повышение зимостойкости растений озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с помощью препарата Моддус / Е.С. Роньжина, А.Е. Рейтер // Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий : тезисы докладов Всерос. науч. конф. с межд. участием и шк. для молодых ученых. Петрозаводск, 21-26 сент. 2015 г. – Петрозаводск : Карельский научный центр РАН, 2015. – 656 с. Библиогр.: с. 453.

112. Рубин Б.А. Курс физиологии растений : Учебник для студентов биол. специальностей ун-тов / Б.А. Рубин. – 3-е изд., перераб. и доп. – М. : Высш. шк., 1971. – 671 с. : ил., портр.

113. Рыбакова М.И. Селекция озимой пшеницы на зимостойкость в комплексе с физиологией // Селекция, семеноводство и интенсивная технология возделывания озимой пшеницы / Всесоюз. акад. с.-х. наук им. В.И. Ленина. – М. : ВО «Агропромиздат», 1989. – 250 с. Библиогр.: с. 117–122.
114. Савич И.М. Изопероксидазы проростков сорго при холодовом стрессе / И.М. Савич // Физиол. и биохим. культурн. раст. – 1989. – Т. 21, № 6. – С. 566–572.
115. Самыгин Г.А. Быстрое определение относительной морозостойкости образцов пшеницы путём промораживания проросших семян // Методы определения морозостойкости растений / АН СССР. Ин-т физиологии растений им. К.А. Тимирязева; Отв. ред. чл.-корр. АН СССР И.И. Туманов. – М. : Наука, 1967. – 88 с. : ил. Библиогр.: с. 77–84.
116. Самыгин Г.А. Причины вымерзания растений / Г.А. Самыгин; АН СССР. Ин-т физиологии растений им. К.А. Тимирязева; Отв. ред. чл.-корр. АПН СССР проф. П.А. Генкель. – М. : Наука, 1974. – 192 с. : ил.
117. Самыгин Г.А. Образование льда в растениях / Г.А. Самыгин // Физиол. раст. – 1997. – Т. 44, № 2. – С. 275–286.
118. Сафина-Осташевская Г.Ф. Действие фунгицидов на дыхательный газообмен корней пшеницы / Г.Ф. Сафина-Осташевская, Л.Х. Гордон // Физиол. раст. – 1984. – Т. 31, № 5. – С. 896–901.
119. Семихатова О.А. Энергетика дыхания растений в норме и при экологическом стрессе // 48-е Тимирязевское чтение. – Л. : Наука, 1990. – 72 с.
120. Семихатова О.А. Дыхание поддержания и адаптация растений / О.А. Семихатова // Физиол. раст. – 1995. – Т. 42, № 2. – С. 312–319.
121. Семихатова О.А. Физиология дыхания растений: Учеб. пособие / О.А. Семихатова, Т.В. Чиркова. – СПб. : Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2001. – 224 с.
122. Семихатова О.А. Растения Севера: дыхание и его связь с продукционным процессом / О.А. Семихатова, Т.И. Иванова, О.В. Кирпичникова // Физиол. раст. – 2009. – Т. 56, № 3. – С. 340–350.

123. Синькевич М.С. Процессы, препятствующие повышению интенсивности перекисного окисления липидов у холодостойких растений при гипотермии / М.С. Синькевич, Н.В. Нарайкина, Т.И. Трунова // Физиол. раст. – 2011. – Т. 58, № 6. – С. 875–882.
124. Скулачев В.П. Энергетика биологических мембран / В.П. Скулачев; АН СССР, Секция хим.-технол. и биол. наук. – М. : Наука, 1989. – 564 с. : ил.
125. Скулачев В.П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода / В.П. Скулачев // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – Т. 7, № 6. – С. 4–10.
126. Сысоева М.И. Роль фитохрома В в формировании холодоустойчивости растений огурца на свету и в темноте / М.И. Сысоева, Е.Ф. Марковская, Е.Г. Шерудило // Физиол. раст. – 2013. – Т. 60, № 3. – С. 393–398.
127. Таланова В.В. Особенности экспрессии АБК-зависимых и АБК-независимых генов при холодовой адаптации растений пшеницы / В.В. Таланова, А.Ф. Титов, Л.В. Топчиева [и др.] // Физиол. раст. – 2011. – Т. 58, № 6. – С. 859–865.
128. Тарчевский И.А. Метаболизм растений при стрессе / И.А. Тарчевский; Рос. акад. наук., Акад. наук Респ. Татарстан. – Казань : ФЭН, 2001. – 448 с. : ил., портр., табл.
129. Татарина Т.Д. Дегидрины в почках *Betula pendula* Roth: особенности сезонной динамики / Т.Д. Татарина, А.А. Перк, В.В. Бубякина [и др.] // Известия Самарского научного центра РАН. – 2013. – Т. 15, № 3–2. – С. 799–801.
130. Титов А.Ф. Влияние специфических ингибиторов транскрипции и трансляции на холодовое и тепловое закаливание растений томата / А.Ф. Титов, В.В. Таланова, С.Н. Дроздов // Физиол. раст. – 1982. – Т. 29, № 4. – С. 790–793.
131. Титов А.Ф. Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур / А.Ф. Титов, Т.В. Акимова, В.В. Таланова [и др.]; Отв. ред. Н.Н. Немова; Ин-т биологии КарНЦ РАН. – М. : Наука, 2006. – 143 с.

132. Титов А.Ф. Устойчивость растений и фитогормоны / А.Ф. Титов, В.В. Таланова; Отв. ред. Н.Н. Немова; Ин-т биологии КарНЦ РАН. – Петрозаводск : Карельский научный центр РАН, 2009. – 206 с.
133. Титов А.Ф. Локальное действие высоких и низких температур на растения / А.Ф. Титов, В.В. Таланова; Отв. ред. Н.Н. Немова; Ин-т биологии КарНЦ РАН. – Петрозаводск : Карельский научный центр РАН, 2011. – 166 с.
134. Трунова Т.И. О вымываемости сахаров из узлов кущения закаленных к морозу растений озимой пшеницы / Т.И. Трунова // Физиол. раст. – 1969. – Т. 16, № 4. – С. 658–665.
135. Трунова Т.И. Влияние ингибиторов белкового синтеза на морозостойкость озимой пшеницы / Т.И. Трунова, Г.Н. Зверева // Физиол. раст. – 1977. – Т. 24, № 2. – С. 395–401.
136. Трунова Т.И. Роль ультраструктуры клеток в формировании морозостойкости озимой пшеницы / Т.И. Трунова, Н.В. Астахова // Доклады Академии наук. – 1998. – Т. 359, № 1. – С. 120–122.
137. Трунова Т.И. Растение и низкотемпературный стресс / Т.И. Трунова; Отв. ред. Вл.В. Кузнецов; Ин-т физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. – М. : Наука, 2007. – 54 с.
138. Трухачёва Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета *Statistica* / Н.В. Трухачёва. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 379 с. : ил., табл.
139. Туманов И.И. Физиология закаливания и морозостойкости растений / И.И. Туманов. – М. : Наука, 1979. – 352 с.
140. Туркова Н.С. О действии на растения ретарданта хлорхолинхлорида в разных дозировках // Регуляция роста растений химическими средствами / Н.С. Туркова, В.А. Калинина; Ред. О.И. Гуликова. – М. : Изд-во Моск. ун-та, 1970. – 167 с. : ил. Библиогр.: с. 56–59.
141. Фролова С.А. Влияние низкотемпературного закаливания на активность протеолитических ферментов и их ингибиторов в листьях проростков

пшеницы и огурца / С.А. Фролова, А.Ф. Титов, В.В. Таланова // Физиол. раст. – 2011. – Т. 58, № 2. – С. 208–212.

142. Хелдт Г.-В. Биохимия растений / Г.-В. Хелдт; пер. с англ. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 471 с. : ил.

143. Хохлова Л.П. Изменения мембран и энергетических функций митохондрий при закаливании и действии картолина / Л.П. Хохлова, О.А. Тимофеева, А.И. Заботин [и др.] // Физиол. раст. – 1990. – Т. 37, № 2. – С. 308–316.

144. Хохлова Л.П. Сезонные изменения митохондрий у закаленных и незакаленных к холоду растений озимой пшеницы / Л.П. Хохлова, Н.Н. Кучеренкова, Й.Р. Абдрахимова // Физиол. раст. – 1993. – Т. 40, № 4. – С. 607–612.

145. Хохлова Л.П. Изменение водоудерживающей способности тканей озимой пшеницы под влиянием структурных модификаторов цитоскелета / Л.П. Хохлова, О.В. Олиневич, О.В. Панкратова // Физиол. раст. – 1997. – Т. 44, № 3. – С. 379–384.

146. Хочачка П. Биохимическая адаптация / П. Хочачка, Дж. Сомеро; Пер. с англ. к.м.н. Н.Н. Алипова, Е.П. Крюковой, к.б.н. Н.П. Матвеевой; Под ред. чл.-корр. АМН СССР И.Б. Збарского. – М. : Мир, 1988. – 568 с. : ил.

147. Чижова С.И. Использование биотеста активности α -амилазы эндосперма ячменя для оценки синтетических регуляторов роста // Регуляторы роста и развития растений : материалы II Всесоюз. конф. по регуляторам роста и развития растений, Киев, 25-27 мая 1988 г. / Отв. ред. Л.И. Мусатенко, В.И. Кефели. – Киев : Наук. думка, 1989. – 325 с. : ил. Библиогр.: с. 312–314.

148. Чижова С.И. Содержание абсцизовой кислоты и рост растений ярового ячменя под действием триазолов / С.И. Чижова, В.В. Павлова, Л.Д. Прусакова // Физиол. раст. – 2005. – Т. 52, № 1. – С. 108–114.

149. Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений : Учебное пособие студентов биологических факультетов вузов / Т.В. Чиркова. – СПб. : СПбГУ, 2002. – 244 с. : ил.

150. Шакирова Ф.М. Роль эндогенной АБК в индуцируемой холодом экспрессии *TADHN* гена дегидрина в проростках пшеницы / Ф.М. Шакирова, Ч.Р. Аллагулова, М.В. Безрукова [и др.] // Физиол. раст. – 2009. – Т. 56, № 5. – С. 796–800.
151. Шаповал О.А. Регуляторы роста растений для овощных культур. Обзор / О.А. Шаповал, В.В. Вакуленко, Л.Д. Прусакова // ГАВРИШ. – 2009. – № 3. – С. 14–19.
152. Шаповал О.А. Ретарданты / О.А. Шаповал, В.В. Вакуленко, И.П. Можарова // Защита и карантин растений. – 2010. – № 8. – С. 4–7.
153. Шаяхметова И.Ш. Роль липидов клеточных мембран в криозакаливании листьев и узлов кущения озимой пшеницы / И.Ш. Шаяхметова, Т.И. Трунова, В.Д. Цыдендамбаев [и др.] // Физиол. раст. – 1990. – Т. 37, № 6. – С. 1186–1195.
154. Шугаев А.Г. Некоторые особенности структурной организации и окислительной активности дыхательной цепи митохондрий растений / А.Г. Шугаев // Успехи современной биологии. – 1991. – Т. 111, № 2. – С. 178–191.
155. Шугаев А.Г. Методы выделения митохондрий растений и определение их интактности // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / А.Г. Шугаев, Д.А. Лаштабега, Н.С. Белозерова [и др.]; Под ред. Вл.В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 487 с. : ил. Библиогр.: с. 448–456.
156. Юрин В.М. Механизмы модификации ион-транспортных свойств плазматической мембраны растительной клетки под действием фунгицида пропиконазола / В.М. Юрин, Т.И. Дитченко // Агрохимия. – 2009. – № 9. – С. 43–53.
157. Юшкевич Л.В. Оптимизация обработки почвы и применения средств химизации при возделывании второй пшеницы после пара в южной лесостепи западной Сибири / Л.В. Юшкевич, А.Г. Щитов, О.Ф. Хамова [и др.] // Достижения науки и техники АПК. – 2013. – № 9. – С. 20–22.

158. Armstrong A.F. Dynamic changes in the mitochondrial electron transport chain underpinning cold acclimation of leaf respiration / A.F. Armstrong, M.R. Badger, D.A. Day [et al.] // *Plant Cell Environ.* – 2008. – V. 31, N 8. – P. 1156–1169.
159. Arnholdt-Schmitt B. Stress-induced cell reprogramming. A role for global genome regulation? / B. Arnholdt-Schmitt // *Plant Physiol.* – 2004. – V. 136, N 1. – P. 2579–2586.
160. Ashworth E.N. Formation and spread of ice in plant tissues // *Horticultural Reviews*, V. 13 / J. Janick. – 1992. – P. 215–255.
161. Atkin O.K. Response of root respiration to changes in temperature and its relevance to global warming / O.K. Atkin, E.J. Edwards, B.R. Loveys // *New Phytol.* – 2000. – V. 147, N 1. – P. 141–154.
162. Atkin O.K. Effect of temperature on rates of alternative and cytochrome pathway respiration and their relationship with the redox poise of the quinone pool / O.K. Atkin, Q. Zhang, J.T. Wiskich // *Plant Physiol.* – 2002. – V. 128, N 1. – P. 212–222.
163. Bakht J. The role of abscisic acid and low temperature in chickpea (*Cicer arietinum*) cold tolerance. II. Effects on plasma membrane structure and function / J. Bakht, A. Bano, P. Dominy // *J. Exp. Bot.* – 2006. – V. 57, N 14. – P. 3707–3715.
164. Ball S. Soluble carbohydrates in two buffalograss cultivars with contrasting freezing tolerance / S. Ball, Y.L. Qian, C. Stushnoff // *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* – 2002. – V. 127, N 1. – P. 45–49.
165. Benton J.M. The modification of phytosterol profiles and *in vitro* photosynthetic electron transport of *Galium aparine* L. (cleavers) treated with the fungicide, epoxiconazole / J.M. Benton, A.H. Cobb // *J. Plant Growth Regul.* – 1997. – V. 22, N 2. – P. 93–100.
166. Bligh E.G. A rapid method of total lipid extraction and purification / E.G. Bligh, W.J. Dyer // *Can. J. Biochem. Physiol.* – 1959. – V. 37, N 8. – P. 911–917.
167. Bock P.E. Another look at the cold lability of enzymes / P.E. Bock, C. Frieden // *Trends Biochem. Sci.* – 1978. – V. 3, N 2. – P. 100–103.

168. Borecký J. Plant uncoupling mitochondrial protein and alternative oxidase: energy metabolism and stress / J. Borecký, A.E. Vercesi // Biosci. Rep. – 2005. – V. 25, N 3–4. – P. 271–286.
169. Borovskii G.B. Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment / G.B. Borovskii, I.V. Stupnikova, A.I. Antipina [et al.] // BMC Plant Biol. – 2002. – V. 2. – P. 5.
170. Bouillaud F. Homologues of the uncoupling protein from brown adipose tissue (UCP1): UCP2, UCP3, BMCP1 and UCP4 / F. Bouillaud, E. Couplan, C. Pecqueur [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2001. – V. 1504, N 1. – P. 107–119.
171. Brandalise M. Overexpression of plant uncoupling mitochondrial protein in transgenic tobacco increases tolerance to oxidative stress / M. Brandalise, I.G. Maia, J. Borecký [et al.] // J. Bioenerg. Biomembr. – 2003. – V. 35, N 3. – P. 203–209.
172. Brush R.A. Characterization and quantification of intrinsic ice nucleators in winter rye (*Secale cereale*) leaves / R.A. Brush, M. Griffith, A. Mlynarz // Plant Physiol. – 1994. – V. 104, N 2. – P. 725–735.
173. Caffrey M. Lipid-sugar interactions. Relevance to anhydrous biology / M. Caffrey, V. Fonseca, A.C. Leopold // Plant Physiol. – 1988. – V. 86, N 3. – P. 754–758.
174. Calderón P. Increase of sucrose synthase activity in wheat plants after a chilling shock / P. Calderón, H.G. Pontis // Plant Sci. – 1985. – 42, N 3. – P. 173–176.
175. Calegario F.F. Stimulation of potato tuber respiration by cold stress is associated with an increased capacity of both plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) and alternative oxidase / F.F. Calegario, R.G. Cosso, M.M. Fagian [et al.] // J. Bioenerg. Biomembr. – 2003. – V. 35, N 3. – P. 211–220.
176. Chance B.W. The respiratory chain and oxidative phosphorylation // Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biology, V. 17 / B.W. Chance, G.R. Williams; F.F. Nord. – 1956. – P. 65–134.

177. Chen H.-H. Characteristics of cold acclimation and deacclimation in tuber-bearing *Solanum* species / H.-H. Chen, P.H. Li // Plant Physiol. – 1980. – V. 65, N 6. – P. 1146–1148.
178. Chichkova N.V. Phytaspase, a relocalisable cell death promoting plant protease with caspase specificity / N.V. Chichkova, J. Shaw, R.A. Galiullina [et al.] // EMBO J. – 2010. – V. 29, N 6. – P. 1149–1161.
179. Christie W.W. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis // Advances in lipid methodology – Two / W.W. Christie. – Oily Press, Dundee, 1993. – P. 69–111.
180. Close T.J. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins / T.J. Close // Physiol. Plant. – 1996. – V. 97, N 4. – P. 795–803.
181. Close T.J. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature / T.J. Close // Physiol. Plant. – 1997. – V. 100, N 2. – P. 291–296.
182. Covey-Crump E.M. Temperature-dependent changes in respiration rates and redox poise of the ubiquinone pool in protoplasts and isolated mitochondria of potato leaves / E.M. Covey-Crump, N.V. Bykova, C. Affourtit [et al.] // Physiol. Plant. – 2007. – V. 129, N 1. – P. 175–184.
183. Crespi M.D. Sucrose synthase expression during cold acclimation in wheat / M.D. Crespi, E.J. Zabaleta, H.G. Pontis [et al.] // Plant Physiol. – 1991. – V. 96, N 3. – P. 887–891.
184. Crowe J.H. Interactions of sugars with membranes / J.H. Crowe, L.M. Crowe, J.F. Carpenter [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 1988. – V. 947, N 2. – P. 367–384.
185. Danyluk J. Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat / J. Danyluk, A. Perron, M. Houde [et al.] // Plant Cell. – 1998. – V. 10, N 4. – P. 623–638.
186. Davik J. Dehydrin, alcohol dehydrogenase, and central metabolite levels are associated with cold tolerance in diploid strawberry (*Fragaria* spp.) / J. Davik, G. Koehler, B. From [et al.] // Planta. – 2013. – V. 237, N 1. – P. 265–277.

187. Davis T.D. Triazole plant growth regulators // Horticultural Reviews, V. 10 / T.D. Davis, G.L. Steffens, N. Sankhla; J. Janick. – 1988. – P. 63–105.
188. Davy de Virville J. Isolation and properties of mitochondria from *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures / J. Davy de Virville, I. Aron, M.F. Alin [et al.] // Plant Physiol. Biochem. – 1994. – V. 32, N 1. – P. 159–166.
189. Deryabin A.N. Cold tolerance of potato plants transformed with yeast invertase gene / A.N. Deryabin, I.M. Dubinina, E.A. Burakhanova [et al.] // Acta Agrobotanica. – 2004. – V. 57, N 1–2. – P. 31–39.
190. Deryabin A.N. Influence of yeast-derived invertase gene expression in potato plants on membrane lipid peroxidation at low temperature / A.N. Deryabin, I.M. Dubinina, E.A. Burakhanova [et al.] // J. Thermal Biol. – 2005. – V. 30, N 1. – P. 73–77.
191. Du Z.-Y. Depletion of the membrane-associated acyl-coenzyme A-binding protein ACBP1 enhances the ability of cold acclimation in *Arabidopsis* / Z.-Y. Du, S. Xiao, Q.-F. Chen [et al.] // Plant Physiol. Biochem. – 2010. – V. 152, N 3. – P. 1585–1597.
192. Duman J.G. Thermal hysteresis protein activity in bacteria, fungi, and phylogenetically diverse plants / J.G. Duman, T.M. Olsen // Cryobiology. – 1993. – V. 30, N 3. – P. 322–328.
193. Duman J.G. Purification and characterization of a thermal hysteresis protein from a plant, the bittersweet nightshade *Solanum dulcamara* / J.G. Duman // Biochim. Biophys. Acta. – 1994. – V. 1206, N 1. – P. 129–135.
194. Eagles C.F. Hardening and dehardening of *Lolium perenne* in response to fluctuating temperatures / C.F. Eagles, J. Williams // Ann. Bot. – 1992. – V. 70, N 4. – P. 333–338.
195. Elhafez D. Characterization of mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenases in *Arabidopsis*: intraorganelle location and expression / D. Elhafez, M.W. Murcha, R. Clifton [et al.] // Plant Cell Physiol. – 2006. – V. 47, N 1. – P. 43–54.

196. Estabrook R.W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP : O ratios / R.W. Estabrook // Meth. Enzymol. – 1967. – V. 10. – P. 41–47.
197. Eyster K.M. The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist / K.M. Eyster // Adv. Physiol. Educ. – 2007. – V. 31, N 1. – P. 5–16.
198. Figueira T.R.S. Differential expression of uncoupling mitochondrial protein and alternative oxidase in the plant response to stress / T.R.S. Figueira, P. Arruda // J. Bioenerg. Biomembr. – 2011. – V. 43, N 1. – P. 67–70.
199. Finnegan P.M. Alternative mitochondrial electron transport proteins in higher plants // Plant mitochondria: from genome to function, V. 17 in Advances in Photosynthesis and Respiration / P.M. Finnegan, K.L. Soole, A.L. Umbach; D.A. Day, A.H. Millar, J. Whelan. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. – P. 163–230.
200. Fiorani F. The alternative oxidase of plant mitochondria is involved in the acclimation of shoot growth at low temperature. A study of Arabidopsis *AOX1a* transgenic plants / F. Fiorani, A.L. Umbach, J.N. Siedow // Plant Physiol. – 2005. – V. 139, N 4. – P. 1795–1805.
201. Fredlund K.M. Oxidation of external NAD(P)H by purified mitochondria from fresh and aged red beetroots (*Beta vulgaris* L.) / K.M. Fredlund, A.G. Rasmusson, I.M. Møller // Plant Physiol. – 1991. – V. 97, N 1. – P. 99–103.
202. Gilley A. Relative efficacy of paclobutrazol, propiconazole and tetraconazole as stress protectants in wheat seedlings / A. Gilley, R.A. Fletcher // J. Plant Growth Regul. – 1997. – V. 21, N 3. – P. 169–175.
203. Goldstein G. Changes in osmotic pressure and mucilage during low-temperature acclimation of *Opuntia ficus-indica* / G. Goldstein, P.S. Nobel // Plant Physiol. – 1991. – V. 97, N 3. – P. 954–961.
204. González-Meler M. A. The effect of growth and measurement temperature on the activity of the alternative respiratory pathway / M.A. González-Meler, M. Ribas-Carbo, L. Giles [et al.] // Plant Physiol. – 1999. – V. 120, N 3. – P. 765–772.

205. Goyal K. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress / K. Goyal, L.J. Walton, A. Tunnacliffe // *Biochem. J.* – 2005. – V. 388, N 1. – P. 151–157.
206. Gulick P.J. Transcriptome comparison of winter and spring wheat responding to low temperature / P.J. Gulick, S. Drouin, Z. Yu [et al.] // *Genome.* – 2005. – V. 48, N 5. – P. 913–923.
207. Gupta R. Antifreeze proteins enable plants to survive in freezing conditions / R. Gupta, R. Deswal // *J. Biosci.* – 2014. – V. 39, N 5. – P. 931–944.
208. Gusta L.V. Effects of temperature on dehardening and rehardening of winter cereals / L.V. Gusta, D.B. Fowler // *Can. J. Plant Sci.* – 1976. – V. 56, N 3. – P. 673–678.
209. Guy C.L. Altered gene expression during cold acclimation of spinach / C.L. Guy, K.J. Niemi, R. Brambl // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1985. – V. 82, N 11. – P. 3673–3677.
210. Guy C.L. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism / C.L. Guy // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1990. – V. 41. – P. 187–223.
211. Guy C.L. Hydration-state-responsive proteins link cold and drought stress in spinach / C.L. Guy, D. Haskell, L. Neven [et al.] // *Planta.* – 1992. – V. 188, N 2. – P. 265–270.
212. Hanin M. Plant dehydrins and stress tolerance. Versatile proteins for complex mechanisms / M. Hanin, F. Brini, C. Ebel [et al.] // *Plant Signal. Behav.* – 2011. – V. 6, N 10. – P. 1503–1509.
213. Hara M. The multifunctionality of dehydrins: an overview / M. Hara // *Plant Signal. Behav.* – 2010. – V. 5, N 5. – P. 503–508.
214. Hare P.D. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction / P.D. Hare, W.A. Cress, J. van Staden // *J. Exp. Bot.* – 1999. – V. 50, N 333. – P. 413–434.

215. Haughan P.A. Sterol requirements and paclobutrazol inhibition of a celery cell culture / P.A. Haughan, J.R. Lenton, L.J. Goad // *Phytochemistry*. – 1988. – V. 27, N 8. – P. 2491–2500.
216. Heber U. Freezing injury and uncoupling of phosphorylation from electron transport in chloroplasts / U. Heber // *Plant Physiol.* – 1967. – V. 42, N 10. – P. 1343–1350.
217. Heidarvand L. What happens in plant molecular responses to cold stress? / L. Heidarvand, R. Maali Amiri // *Acta Physiol. Plant.* – 2010. – V. 32, N 3. – P. 419–431.
218. Houde M. Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues / M. Houde, C. Daniel, M. Lachapelle [et al.] // *Plant. J.* – 1995. – V. 8, N 4. – P. 583–593.
219. Hourton-Cabassa C. The plant uncoupling protein homologues: a new family of energy-dissipating proteins in plant mitochondria / C. Hourton-Cabassa, A. Rita Matos, A. Zachowski [et al.] // *Plant Physiol. Biochem.* – 2004. – V. 42, N 4. – P. 283–290.
220. Hradilík J. Interakce mezi giberelinem (GA₃) a paclobutrazolem (PP 333) u salátu, hrachu a lnu / J. Hradilík, H. Fišerová // *Acta univ. agric. (Brno), fac. agron.* – 1986. – V. 35, N 4. – P. 5–11.
221. Hugly S. A role for membrane lipid polyunsaturation in chloroplast biogenesis at low temperature / S. Hugly, C. Somerville // *Plant Physiol.* – 1992. – V. 99, N 1. – P. 197–202.
222. Iivonen S. Effects of temperature and nutrient availability on plasma membrane lipid composition in Scots pine roots during growth initiation / S. Iivonen, P. Saranpää, M.-L. Sutinen [et al.] // *Tree Physiol.* – 2004. – V. 24, N 4. – P. 437–446.
223. Inaba M. Gene-engineered rigidification of membrane lipids enhances the cold inducibility of gene expression in *Synechocystis* / M. Inaba, I. Suzuki, B. Szalontai [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278, N 14. – P. 12191–12198.

224. Ingram J. The molecular basis of dehydration tolerance in plants / J. Ingram, D. Bartels // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1996. – V. 47. – P. 377–403.
225. Iordachescu M. Trehalose biosynthesis in response to abiotic stresses / M. Iordachescu, R. Imai // *J. Integr. Plant Biol.* – 2008. – V. 50, N 10. – P. 1223–1229.
226. Ishibashi M. Variation of freezing tolerance, *Cor/Lea* gene expression and vernalization requirement in Japanese common wheat / M. Ishibashi, F. Kobayash, J. Nakamura [et al.] // *Plant Breed.* – 2007. – V. 126, N 5. – P. 464–469.
227. Ishizaki-Nishizawa O. Low-temperature resistance of higher plants is significantly enhanced by a nonspecific cyanobacterial desaturase / O. Ishizaki-Nishizawa, T. Fujii, M. Azuma [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 1996. – V. 14, N 8. – P. 1003–1006.
228. Israelachvili J. Role of hydration and water structure in biological and colloidal interactions / J. Israelachvili, H. Wennerström // *Nature.* – 1996. – V. 379, N 6562. – P. 219–225.
229. Ito K. Isolation of two distinct cold-inducible cDNAs encoding plant uncoupling proteins from the spadix of skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*) / K. Ito // *Plant Sci.* – 1999. – V. 149, N 2. – P. 167–173.
230. Jezek P. Reconstituted plant uncoupling mitochondrial protein allows for proton translocation via fatty acid cycling mechanism / P. Jezek, A.D.T. Costa, A.E. Vercesi // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272, N 39. – P. 24272–24278.
231. Jezek P. Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins / P. Jezek, H. Engstová, M. Žáčková [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1998. – V. 1365, N 1–2. – P. 319–327.
232. Jezek P. Occurrence of plant-uncoupling mitochondrial protein (PUMP) in diverse organs and tissues of several plants / P. Jezek, M. Žáčková, J. Košarová [et al.] // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2000. – V. 32, N 6. – P. 549–561.
233. Jezek P. Possible basic and specific functions of plant uncoupling proteins (pUCP) / P. Jezek, J. Borecký, M. Žáčková [et al.] // *Biosci. Rep.* – 2001. – V. 21, N 2. – P. 237–245.

234. Jørgensen M. De-hardening in contrasting cultivars of timothy and perennial ryegrass during winter and spring / M. Jørgensen, L. Østrem, M. Höglind // Grass Forage Sci. – 2010. – V. 65, N 1. – P. 38–48.
235. Kalberer Scott R. Deacclimation and reacclimation of cold-hardy plants: current understanding and emerging concepts (Review) / Scott R. Kalberer, M. Wisniewski, R. Arora // Plant Sci. – 2006. – V. 171, N 1. – P. 3–16.
236. Kaplan F. β -amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock / F. Kaplan, C.L. Guy // Plant Physiol. – 2004. – V. 135, N 3. – P. 1674–1684.
237. Kende H. The five “classical” plant hormones / H. Kende, J. Zeevaart // Plant Cell. – 1997. – V. 9, N 7. – P. 1197–1210.
238. Kerepesi I. Cold acclimation and abscisic acid induced alterations in carbohydrate content in calli of wheat genotypes differing in frost tolerance / I. Kerepesi, E. Bányai-Stefanovits, G. Galiba // Plant Physiol. – 2004. – V. 161, N 1. – P. 131–133.
239. Knight C.A. Inhibition of recrystallization of ice by insect thermal hysteresis proteins: a possible cryoprotective role / C.A. Knight, J.G. Duman // Cryobiology. – 1986. – V. 23, N 3. – P. 256–262.
240. Knight C.A. Adsorption to ice of fish antifreeze glycopeptides 7 and 8 / C.A. Knight, E. Driggers, A.L. DeVries // Biophys. J. – 1993. – V. 64, N 1. – P. 252–259.
241. Knight H. Cold calcium signaling in Arabidopsis involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation / H. Knight, A.J. Trewavas, M.R. Knight // Plant Cell. – 1996. – V. 8, N 3. – P. 489–503.
242. Kornfeld A. Respiratory flexibility and efficiency are affected by simulated global change in Arctic plants / A. Kornfeld, M. Heskell, O.K. Atkin [et al.] // New Phytol. – 2013. – V. 197, N 4. – P. 1161–1172.
243. Korsukova A.V. The tebuconazole-based protectant of seeds “Bunker” induces the synthesis of dehydrins during cold hardening and increases the frost

resistance of wheat seedlings / A.V. Korsukova, O.A. Borovik, O.I. Grabelnych [et al.] // Journal of Stress Physiology and Biochemistry. – 2015. – V. 11, N 4. – P. 118–127.

244. Kosová K. Complex phytohormone responses during the cold acclimation of two wheat cultivars differing in cold tolerance, winter Samanta and spring Sandra / K. Kosová, I.T. Prášil, P. Vítámvás [et al.] // Plant Physiol. – 2012. – V. 169, N 6. – P. 567–576.

245. Koster K.L. Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of Puma rye / K.L. Koster, D.V. Lynch // Plant Physiol. – 1992. – V. 98, N 1. – P. 108–113.

246. Kovacs D. Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins / D. Kovacs, E. Kalmar, Z. Torok [et al.] // Plant Physiol. – 2008. – V. 147, N 1. – P. 381–390.

247. Kowaltowski A.J. Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain / A.J. Kowaltowski, A.D.T. Costa, A.E. Vercesi // FEBS Lett. – 1998. – V. 425, N 2. – P. 213–216.

248. Kozloff L.M. Formation of bacterial membrane ice-nucleating lipoglycoprotein complexes / L.M. Kozloff, M.A. Turner, F. Arellano // J. Bacteriol. – 1991. – V. 173, N 20. – P. 6528–6536.

249. Kraus T.E. Paclobutrazol protects wheat seedlings from heat and paraquat injury. Is detoxification of active oxygen involved? / T.E. Kraus, R.A. Fletcher // Plant Cell Physiol. – 1994. – V. 35, N 1. – P. 45–52.

250. Kume S. Differential and coordinated expression of *Cbf* and *Cor/Lea* genes during long-term cold acclimation in two wheat cultivars showing distinct levels of freezing tolerance / S. Kume, F. Kobayashi, M. Ishibashi [et al.] // Genes Genet. Syst. – 2005. – V. 80, N 3. – P. 185–197.

251. Kurkela S. Cloning and characterization of a cold- and ABA-inducible *Arabidopsis* gene / S. Kurkela, M. Frank // Plant Mol. Biol. – 1990. – V. 15, N 1. – P. 137–144.

252. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature*. – 1970. – V. 227, N 5259. – P. 680–685.
253. Li W. The plasma membrane-bound phospholipase D δ enhances freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* / W. Li, M. Li, W. Zhang [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2004. – V. 22, N 4. – P. 427–433.
254. Li W. Differential degradation of extraplastidic and plastidic lipids during freezing and post-freezing recovery in *Arabidopsis thaliana* / W. Li, R. Wang, M. Li [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2008. – V. 283, N 1. – P. 461–468.
255. Lissarre M. Cold-responsive gene regulation during cold acclimation in plants / M. Lissarre, M. Ohta, A. Sato [et al.] // *Plant Signal. Behav.* – 2010. – V. 5, N 8. – P. 948–952.
256. Liu L. Effects of exogenous abscisic acid on carbohydrate metabolism and the expression levels of correlative key enzymes in winter wheat under low temperature / L. Liu, J. Cang, J. Yu [et al.] // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2013. – V. 77, N 3. – P. 516–525.
257. Liu X.-Y. Overexpression of tomato chloroplast omega-3 fatty acid desaturase gene alleviates the photoinhibition of photosystems 2 and 1 under chilling stress / X.-Y. Liu, B. Li, J.-H. Yang [et al.] // *Photosynthetica*. – 2008. – V. 46, N 2. – P. 185–192.
258. Los D.A. Structure and expression of fatty acid desaturases / D.A. Los, N. Murata // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1998. – V. 1394, N 1. – P. 3–15.
259. Lowry O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1951. – V. 193, N 1. – P. 265–275.
260. Lucangeli C.D. Effects of *Azospirillum* spp. on endogenous gibberellin content and growth of maize (*Zea mays* L.) treated with uniconazole / C.D. Lucangeli, R. Bottini // *Symbiosis*. – 1997. – V. 23, N 1. – P. 63–72.

261. Lyons J.M. Relationship between the physical nature of mitochondrial membranes and chilling sensitivity in plants / J.M. Lyons, T.A. Wheaton, H.K. Pratt // *Plant Physiol.* – 1964. – V. 39, N 2. – P. 262–268.
262. Lyons J.M. Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury / J.M. Lyons, J.K. Raison // *Plant Physiol.* – 1970. – V. 45, N 4. – P. 386–389.
263. Lyons J.M. Chilling injury in plants / J.M. Lyons // *Annu. Rev. Plant Physiol.* – 1973. – V. 24. – P. 445–466.
264. Macfarlane C. Plant mitochondria electron partitioning is independent of short-term temperature changes / C. Macfarlane, L.D. Hansen, I. Florez-Sarasa [et al.] // *Plant Cell Environ.* – 2009. – V. 32, N 5. – P. 585–591.
265. Maia I.G. *AtPUMP*: an *Arabidopsis* gene encoding a plant uncoupling mitochondrial protein / I.G. Maia, C.E. Benedetti, A. Leite [et al.] // *FEBS Lett.* – 1998. – V. 429, N 3. – P. 403–406.
266. Matos A.R. Alternative oxidase involvement in cold stress response of *Arabidopsis thaliana fad2* and *FAD3+* cell suspensions altered in membrane lipid composition / A.R. Matos, C. Hourton-Cabassa, D. Cicek [et al.] // *Plant Cell Physiol.* – 2007. – V. 48, N 6. – P. 856–865.
267. Miller R.W. Structural and functional responses of wheat mitochondrial membranes to growth at low temperatures / R.W. Miller, I. de la Roche, M.K. Pomeroy // *Plant Physiol.* – 1974. – V. 53, N 3. – P. 426–433.
268. Minami A. Dynamic compositional changes of detergent-resistant plasma membrane microdomains during plant cold acclimation // A. Minami, A. Furuto, M. Uemura // *Plant Signal. Behav.* – 2010. – V. 5, N 9. – P. 1115–1118.
269. Mizuno N. Mitochondrial alternative pathway is associated with development of freezing tolerance in common wheat / N. Mizuno, A. Sugie, F. Kobayashi [et al.] // *Plant Physiol.* – 2008. – V. 165, N 4. – P. 462–467.
270. Møller I.M. A specific role for Ca^{2+} in the oxidation of exogenous NADH by Jerusalem-artichoke (*Helianthus tuberosus*) mitochondria / I.M. Møller, S.P. Johnston, J.M. Palmer // *Biochem. J.* – 1981. – V. 194, N 2. – P. 487–495.

271. Møller I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species / I.M. Møller // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 2001. – V. 52. – P. 561–591.
272. Moons A. Molecular and physiological responses to abscisic acid and salts in roots of salt-sensitive and salt-tolerant Indica rice varieties / A. Moons, G. Bauw, E. Prinsen [et al.] // *Plant Physiol.* – 1995. – V. 107, N 1. – P. 177–186.
273. Murata N. Membrane fluidity and temperature perception / N. Murata, D.A. Los // *Plant Physiol.* – 1997. – V. 115, N 3. – P. 875–879.
274. Nishida I. Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids / I. Nishida, N. Murata // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1996. – V. 47. – P. 541–568.
275. Nogueira Fábio T.S. Genomic structure and regulation of mitochondrial uncoupling protein genes in mammals and plants / Fábio T.S. Nogueira, J. Borecký, A.E. Vercesi [et al.] // *Biosci. Rep.* – 2005. – V. 25, N 3–4. – P. 209–226.
276. Nogueira Fábio T.S. *Arabidopsis thaliana* Uncoupling Proteins (AtUCPs): insights into gene expression during development and stress response and epigenetic regulation / Fábio T.S. Nogueira, F.T. Sasaki, I.G. Maia // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2011. – V. 43, N 1. – P. 71–79.
277. Ögren E. Relationship between temperature, respiratory loss of sugar and premature dehardening in dormant Scots pine seedlings / E. Ögren // *Tree Physiol.* – 1997. – V. 17, N 1. – P. 47–51.
278. Onda Y. Functional coexpression of the mitochondrial alternative oxidase and uncoupling protein underlies thermoregulation in the thermogenic florets of skunk cabbage / Y. Onda, Y. Kato, Y. Abe [et al.] // *Plant Physiol.* – 2008. – V. 146, N 2. – P. 636–645.
279. Orlova I.V. Transformation of tobacco with a gene for the thermophilic acyl-lipid desaturase enhances the chilling tolerance of plants / I.V. Orlova, T.S. Serebriiskaya, V. Popov [et al.] // *Plant Cell Physiol.* – 2003. – V. 44, N 4. – P. 447–450.

280. Pagter M. Changes in carbohydrates, ABA and bark proteins during seasonal cold acclimation and deacclimation in *Hydrangea* species differing in cold hardiness / M. Pagter, C.R. Jensen, K.K. Petersen [et al.] // *Physiol. Plant.* – 2008. – V. 134, N 3. – P. 473–485.
281. Parent B. Drought and abscisic acid effects on aquaporin content translate into changes in hydraulic conductivity and leaf growth rate: a trans-scale approach / B. Parent, C. Hachez, E. Redondo [et al.] // *Plant Physiol.* – 2009. – V. 149, N 4. – P. 2000–2012.
282. Pennycooke J.C. Expression of an α -galactosidase gene in *Petunia* is upregulated during low-temperature deacclimation / J.C. Pennycooke, R. Vepachedu, C. Stushnoff // *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* – 2004. – V. 129, N 4. – P. 491–496.
283. Perales L. A relationship between tolerance to dehydration of rice cell lines and ability for ABA synthesis under stress / L. Perales, V. Arbona, A. Gómez-Cadenas [et al.] // *Plant Physiol. Biochem.* – 2005. – V. 43, N 8. – P. 786–792.
284. Pomeroy M.K. Effect of temperature on respiration of mitochondria and shoot segments from cold hardened and nonhardened wheat and rye seedlings / M.K. Pomeroy, C.J. Andrews // *Plant Physiol.* – 1975. – V. 56, N 5. – P. 703–706.
285. Pomeroy M.K. Ultrastructural changes during swelling and contraction of mitochondria from cold-hardened and non-hardened winter wheat / M.K. Pomeroy // *Plant Physiol.* – 1977. – V. 59, N 2. – P. 250–255.
286. Prasad T.K. Localization and characterization of peroxidases in the mitochondria of chilling-acclimated maize seedlings / T.K. Prasad, M.D. Anderson, C.R. Stewart // *Plant Physiol.* – 1995. – V. 108, N 4. – P. 1597–1605.
287. Radkova M. Development- and cold-regulated accumulation of cold shock domain proteins in wheat / M. Radkova, P. Vítámvás, K. Sasaki [et al.] // *Plant Physiol. Biochem.* – 2014. – V. 77. – P. 44–48.
288. Rapacz M. Cold-deacclimation of oilseed rape (*Brassica napus* var. *oleifera*) in response to fluctuating temperatures and photoperiod / M. Rapacz // *Ann. Bot.* – 2002. – V. 89, N 5. – P. 543–549.

289. Rasmusson A.G. The multiplicity of dehydrogenases in the electron transport chain of plant mitochondria / A.G. Rasmusson, D.A. Geisler, I.M. Møller // *Mitochondrion*. – 2008. – V. 8, N 1. – P. 47–60.
290. Roberts D.W.A. The invertase complement of cold-hardy and cold-sensitive wheat leaves / D.W.A. Roberts // *Canad. J. Bot.* – 1975. – V. 53, N 13. – P. 1333–1337.
291. Rorat T. Plant dehydrins – tissue location, structure and function / T. Rorat // *Cell Mol. Biol. Lett.* – 2006. – V. 11, N 4. – P. 536–556.
292. Ruelland E. Activation of phospholipases C and D is an early response to a cold exposure in *Arabidopsis* suspension cells / E. Ruelland, C. Cantrel, M. Gawer [et al.] // *Plant Physiol.* – 2002. – V. 130, N 2. – P. 999–1007.
293. Rurek M. Diverse accumulation of several dehydrin-like proteins in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), *Arabidopsis thaliana* and yellow lupin (*Lupinus luteus*) mitochondria under cold and heat stress / M. Rurek // *BMC Plant Biol.* – 2010. – V. 10. – P. 181.
294. Sáez-Vásquez J. A rapeseed cold-inducible transcript encodes a phosphoenolpyruvate carboxykinase / J. Sáez-Vásquez, M. Raynal, M. Delseny // *Plant Physiol.* – 1995. – V. 109, N 2. – P. 611–618.
295. Santarius K.A. Freezing of isolated thylakoid membranes in complex media. VIII. Differential cryoprotection by sucrose, proline and glycerol / K.A. Santarius // *Physiol. Plant.* – 1992. – V. 84, N 1. – P. 87–93.
296. Sarhan F. The wheat *wcs120* gene family. A useful model to understand the molecular genetics of freezing tolerance in cereals / F. Sarhan, F. Ouellet, A. Vazquez-Tello // *Physiol. Plant.* – 1997. – V. 101, N 2. – P. 439–445.
297. Sasaki H. Changes in sugar content during cold acclimation and deacclimation of cabbage seedlings / H. Sasaki, K. Ichimura, M. Oda // *Ann. Bot.* – 1996. – V. 78, N 3. – P. 365–369.
298. Shi K. Flexible change and cooperation between mitochondrial electron transport and cytosolic glycolysis as the basis for chilling tolerance in tomato plants / K. Shi, L.-J. Fu, S. Zhang [et al.] // *Planta*. – 2013. – V. 237, N 2. – P. 589–601.

299. Shinkawa R. Absciscic acid induced freezing tolerance in chilling-sensitive suspension cultures and seedlings of rice / R. Shinkawa, A. Morishita, K. Amikura [et al.] // BMC Res. Notes. – 2013. – V. 6. – P. 351.
300. Siedow J.N. The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity / J.N. Siedow, A.L. Umbach // Biochim. Biophys. Acta. – 2000. – V. 1459, N 2–3. – P. 432–439.
301. Skriver K. Gene expression in response to absciscic acid and osmotic stress / K. Skriver, J. Mundy // Plant Cell. – 1990. – V. 2, N 6. – P. 503–512.
302. Skulachev V.P. Anion carriers in fatty acid-mediated physiological uncoupling / V.P. Skulachev // J. Bioenerg. Biomembr. – 1999. – V. 31, N 5. – P. 431–445.
303. Smith A.M.O. Activation and function of mitochondrial uncoupling protein in plants / A.M.O. Smith, R.G. Ratcliffe, L.J. Sweetlove // J. Biol. Chem. – 2004. – V. 279, N 50. – P. 51944–51952.
304. Steffen K.L. Effect of light on photosynthetic capacity during cold acclimation in a cold-sensitive and a cold-tolerant potato species / K.L. Steffen, J.P. Palta // Physiol. Plant. – 1986. – V. 66, N 3. – P. 353–359.
305. Steinbach H.S. Hormonal regulation of dormancy in developing sorghum seeds / H.S. Steinbach, R.L. Benech-Arnold, R.A. Sanchez // Plant Physiol. – 1997. – V. 113, N 1. – P. 149–154.
306. Stupnikova I. Pea seed mitochondria are endowed with a remarkable tolerance to extreme physiological temperatures / I. Stupnikova, A. Benamar, D. Tolleter [et al.] // Plant Physiol. – 2006. – V. 140, N 1. – P. 326–335.
307. Sugie A. Overexpression of wheat alternative oxidase gene *Waox1a* alters respiration capacity and response to reactive oxygen species under low temperature in transgenic *Arabidopsis* / A. Sugie, N. Naydenov, N. Mizuno [et al.] // Genes Genet. Syst. – 2006. – V. 81, N 5. – P. 349–354.
308. Sun X. Effects of molybdenum on expression of cold-responsive genes in absciscic acid (ABA)-dependent and ABA-independent pathways in winter wheat under

low-temperature stress / X. Sun, C. Hu, Q. Tan [et al.] // Ann. Bot. – 2009. – V. 104, N 2. – P. 345–356.

309. Svenning M.M. Frost tolerance and biochemical changes during hardening and dehardening in contrasting white clover populations / M.M. Svenning, K. Røsnes, O. Junttila // Physiol. Plant. – 1997. – V. 101, N 1. – P. 31–37.

310. Sweetlove L.J. Mitochondrial uncoupling protein is required for efficient photosynthesis / L.J. Sweetlove, A. Lytovchenko, M. Morgan [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – V. 103, N 51. – P. 19587–19592.

311. Szalai G. Light-induced frost tolerance differs in winter and spring wheat plants / G. Szalai, M. Pap, T. Janda // Plant Physiol. – 2009. – V. 166, N 16. – P. 1826–1831.

312. Tabaei-Aghdaei S.R. Sugars regulate cold-induced gene expression and freezing-tolerance in barley cell cultures / S.R. Tabaei-Aghdaei, R.S. Pearce, P. Harrison // J. Exp. Bot. – 2003. – V. 54, N 387. – P. 1565–1575.

313. Takahashi D. Plant plasma membrane proteomics for improving cold tolerance / D. Takahashi, B. Li, T. Nakayama [et al.] // Front. Plant Sci. – 2013. – V. 4. – P. 90.

314. Takumi S. Cold-specific and light-stimulated expression of a wheat (*Triticum aestivum* L.) *Cor* gene *Wcor15* encoding a chloroplast-targeted protein / S. Takumi, A. Koike, M. Nakata [et al.] // J. Exp. Bot. – 2003. – V. 54, N 391. – P. 2265–2274.

315. Theocharis A. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures / A. Theocharis, C. Clément, E.A. Barka // Planta. – 2012. – V. 235, N 6. – P. 1091–1105.

316. Thomashow M.F. Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance / M.F. Thomashow // Plant Physiol. – 1998. – V. 118, N 1. – P. 1–8.

317. Thomashow M.F. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms / M.F. Thomashow // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1999. – V. 50. – P. 571–599.

318. Tronsmo A.M. Carbohydrate content and glycosidase activities following cold hardening in two grass species / A.M. Tronsmo, G. Kobro, S. Morgenlie [et al.] // *Physiol. Plant.* – 1993. – V. 88, N 4. – P. 689–695.
319. Trunova T.I. The role of photosynthesis in hardening to frost of winter wheat and rye / T.I. Trunova, S.V. Klimov, N.V. Astachova [et al.] // *Acta Agronomica Hungarica.* – 1997. – V. 45, N 3. – P. 209–213.
320. Tsuda K. New members of a cold-responsive group-3 *Lea/Rab*-related *Cor* gene family from common wheat (*Triticum aestivum* L.) / K. Tsuda, S. Tsvetanov, S. Takumi [et al.] // *Genes Genet. Syst.* – 2000. – V. 75, N 4. – P. 179–188.
321. Van Aken O. Defining the mitochondrial stress response in *Arabidopsis thaliana* / O. Van Aken, B. Zhang, C. Carrie [et al.] // *Mol. Plant.* – 2009. – V. 2, N 6. – P. 1310–1324.
322. Van Zee K. Cold requirement for maximal activity of the bacterial ice nucleation protein INAZ in transgenic plants / K. Van Zee, D.A. Baertlein, S.E. Lindow [et al.] // *Plant Mol. Biol.* – 1996. – V. 30, N 1. – P. 207–211.
323. Vercesi A.E. The discovery of an uncoupling mitochondrial protein in plants / A.E. Vercesi // *Biosci. Rep.* – 2001. – V. 21, N 2. – P. 195–200.
324. Vereshchagin A.G. On the role of cell membrane lipids in cold hardening of winter wheat leaves and crowns / A.G. Vereshchagin, T.I. Trunova, I.S. Shayakhmetova [et al.] // *Plant Physiol. Biochem.* – 1990. – V. 28, N 5. – P. 623–630.
325. Vergnolle C. The cold-induced early activation of phospholipase C and D pathways determines the response of two distinct clusters of genes in *Arabidopsis* cell suspensions / C. Vergnolle, M.-N. Vaultier, L. Taconnat [et al.] // *Plant Physiol.* – 2005. – V. 139, N 3. – P. 1217–1233.
326. Verslues P.E. Role of abscisic acid (ABA) and *Arabidopsis thaliana* ABA-insensitive loci in low water potential-induced ABA and proline accumulation / P.E. Verslues, E.A. Bray // *J. Exp. Bot.* – 2006. – V. 57, N 1. – P. 201–212.
327. Vettakkorumakankav N.N. A crucial role for gibberellins in stress protection of plants / N.N. Vettakkorumakankav, D. Falk, P. Saxena [et al.] // *Plant Cell Physiol.* – 1999. – V. 40, N 5. – P. 542–548.

328. Vianello A. Plant mitochondrial pathway leading to programmed cell death / A. Vianello, M. Zancani, C. Peresson [et al.] // *Physiol. Plant.* – 2007. – V. 129, N 1. – P. 242–252.
329. Vítamvás P. Analysis of proteome and frost tolerance in chromosome 5A and 5B reciprocal substitution lines between two winter wheats during long-term cold acclimation / P. Vítamvás, I. T. Prášil, K. Kosová [et al.] // *Proteomics.* – 2012. – V. 12, N 1. – P. 68–85.
330. Wang J. Impact of mitochondrial alternative oxidase expression on the response of *Nicotiana tabacum* to cold temperature / J. Wang, N. Rajakulendran, S. Amirsadeghi [et al.] // *Physiol. Plant.* – 2011. – V. 142, N 4. – P. 339–351.
331. Wang S.Y. Translocation of paclobutrazol, a gibberellin biosynthesis inhibitor, in apple seedlings / S.Y. Wang, T. Sun, M. Faust // *Plant Physiol.* – 1986. – V. 82, N 1. – P. 11–14.
332. Wang X. Profiling lipid changes in plant response to low temperatures / X. Wang, W. Li, M. Li [et al.] // *Physiol. Plant.* – 2006. – V. 126, N 1. – P. 90–96.
333. Wang X.-F. Absciscic acid receptors: multiple signal-perception sites / X.-F. Wang, D.-P. Zhang // *Ann. Bot.* – 2008. – V. 101, N 3. – P. 311–317.
334. Webb M.S. Effects of COR6.6 and COR15am polypeptides encoded by COR (cold-regulated) genes of *Arabidopsis thaliana* on dehydration-induced phase transitions of phospholipid membranes / M.S. Webb, S.J. Gilmour, M.F. Thomashow [et al.] // *Plant Physiol.* – 1996. – V. 111, N 1. – P. 301–312.
335. Webster D.E. Effects of nitrogen and potassium fertilization on perennial ryegrass cold tolerance during deacclimation in late winter and early spring / D.E. Webster, J.S. Ebdon // *HortScience.* – 2005. – V. 40, N 3. – P. 842–849.
336. Welte R. Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D α in freezing-induced lipid changes in *Arabidopsis* / R. Welte, W. Li, M. Li [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277, N 35. – P. 31994–32002.
337. Williams R.J. Anomalous behavior of ice in solutions of ice-binding arabinoxylans / R.J. Williams // *Thermochim. Acta.* – 1992. – V. 212, N 1. – P. 105–113.

338. Winfield M.O. Plant responses to cold: transcriptome analysis of wheat / M.O. Winfield, C. Lu, I.D. Wilson [et al.] // Plant Biotechnol. J. – 2010. – V. 8, N 7. – P. 749–771.
339. Yan S.-P. Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice / S.-P. Yan, Q.-Y. Zhang, Z.-C. Tang [et al.] // Mol. Cell. Proteomics. – 2006. – V. 5, N 3. – P. 484–496.
340. Yim K.-O. Growth responses and allocation of assimilates of rice seedlings by paclobutrazol and gibberellin treatment / K.-O. Yim, Y.W. Kwon, D.E. Bayer // J. Plant Growth Regul. – 1997. – V. 16, N 1. – P. 35–41.
341. Yoshida S. Phospholipid changes associated with the cold hardiness of cortical cells from poplar stem / S. Yoshida, A. Sakai // Plant Cell Physiol. – 1973. – V. 14, N 2. – P. 353–359.
342. Yoshida S. Reverse changes in plasma membrane properties upon deacclimation of Mulberry trees (*Morus bombycis* Koidz.) / S. Yoshida // Plant Cell Physiol. – 1986. – V. 27, N 1. – P. 83–89.
343. Yoshioka K. Identification of a gene for putative *myo*-inositol oxygenase that is specifically induced by cold deacclimation treatment in *Arabidopsis thaliana* / K. Yoshioka, R. Yano, M. Nakamura [et al.] // Supplement Plant Cell Physiol. – 2004. – V. 44 – P. 270.
344. Zabotin A.I. Oligosaccharin and ABA synergistically affect the acquisition of freezing tolerance in winter wheat / A.I. Zabotin, T.S. Barisheva, O.I. Trofimova [et al.] // Plant Physiol. Biochem. – 2009. – V. 47, N 9. – P. 854–858.
345. Zeng Y. Detection of sugar accumulation and expression levels of correlative key enzymes in winter wheat (*Triticum aestivum*) at low temperatures / Y. Zeng, J. Yu, J. Cang [et al.] // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2011. – V. 75, N 4. – P. 681–687.
346. Zottini M. Oxidation of external NAD(P)H by mitochondria from taproots and tissue cultures of sugar beet (*Beta vulgaris*) / M. Zottini, G. Mandolino, D. Zannoni // Plant Physiol. – 1993. – V. 102, N 2. – P. 579–585.