

На правах рукописи



БОРОВИК Ольга Андреевна

**ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ АЛЬТЕРНАТИВНОЙ ОКСИДАЗЫ И
НАД(Ф)-Н-ДЕГИДРОГЕНАЗ II ТИПА В МИТОХОНДРИЯХ ИЗ
ЭТИОЛИРОВАННЫХ И ЗЕЛЕННЫХ ПОБЕГОВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ
ПРИ ХОЛОДОВОМ ЗАКАЛИВАНИИ**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Иркутск – 2015

Работа выполнена в лаборатории физиологической генетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент
Грабельных Ольга Ивановна

Официальные оппоненты:

Илли Иван Экидиусович
доктор биологических наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования Иркутская
государственная сельскохозяйственная
академия, профессор кафедры
агрэкологии, агрохимии, физиологии и
защиты растений

Таланова Вера Викторовна
доктор биологических наук, Федеральное
государственное бюджетное
образовательное учреждение науки
Институт биологии Карельского научного
центра Российской академии наук, главный
научный сотрудник лаборатории
экологической физиологии растений

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт физиологии
растений им. К.А. Тимирязева Российской
академии наук

Защита диссертации состоится «17» июня 2015 г. в 12⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 003.047.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Сибирском институте физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук по адресу: 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317.

Факс: (3952) 510754; e-mail: matmod@sifibr.irk.ru; веб-сайт: <http://www.sifibr.irk.ru>

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук

Автореферат разослан «__» _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
Д 003.047.01,
кандидат биологических наук



Г.П. Акимова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Устойчивость растений к низким температурам формируется в результате холодового закаливания (Туманов, 1979; Трунова, 2007). Поскольку фотосинтез и дыхание являются основными путями углеродного и энергетического метаболизма в растениях (Головко, 1999; Медведев, 2013; Vanlerberghe, 2013), то от их эффективности зависит успешность холодового закаливания. Все больше данных свидетельствуют о тесном взаимодействии хлоропластов и митохондрий через внутриклеточные пулы интермедиатов (Araújo et al., 2014). Дыхательная цепь растительных митохондрий содержит цианид-резистентную альтернативную оксидазу (АО) и ротенон-нечувствительные НАД(Ф)·Н-дегидрогеназы (НАД(Ф)·Н-ДГ II типа) (Finnegan et al., 2004). Данные ферменты не вносят вклад в образование протонного градиента и синтез АТФ, однако они выполняют важные функции в растительной клетке, в том числе обеспечивая связь митохондрий и хлоропластов. Выявлена важная роль АО в защите электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) хлоропластов от фотоингибирования при избыточном освещении (Zhang et al., 2010; Florez-Sarasa et al., 2011). «Внутренняя» НАД·Н-ДГ II типа играет важную роль в поддержании фотодыхания (Svensson and Rasmusson, 2001), а функционирование «внешней» НАДФ·Н-ДГ, вероятно, способствует поддержанию окислительно-восстановительного баланса хлоропластов (Finnegan et al., 2004). АО принимает участие в ответной реакции растений на низкую температуру (Vanlerberghe, 2013), и ее функция при этом, вероятно, связана с предотвращением развития окислительного стресса (Blokina and Fagerstedt, 2010). Показано сохранение способности митохондрий из гетеротрофных тканей растений окислять «внешний» НАД·Н при действии низких температур (Fredlund et al., 1991; Zottini et al., 1993; Stupnikova et al., 2006).

Следует признать, что функционирование АО и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-ДГ в растительных митохондриях как гетеротрофных, так и фотоавтотрофных тканей при холодовом закаливании недостаточно изучено, не выяснено как изменение углеводного статуса при холодовом закаливании растений влияет на активность митохондрий и митохондриальных систем, несопряженных с синтезом АТФ. Также отсутствуют сведения о сопряженности функционирования АО с НАД(Ф)·Н-ДГ II типа в этих условиях.

Целью работы явился сравнительный анализ функционирования альтернативной оксидазы и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ в митохондриях этиолированных и зеленых побегов озимой пшеницы при холодовом закаливании и выяснение возможных механизмов регуляции их активности.

В задачи исследования входило: 1) изучить параметры низкотемпературного закаливания (ингибирование роста, синтез дегидринов, содержание водорастворимых углеводов) и морозоустойчивость этиолированных и зеленых растений озимой пшеницы; 2) изучить функционирование альтернативной оксидазы и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ в митохондриях из побегов этиолированных проростков, этиолированных и

зеленых листьев озимой пшеницы; 3) провести сравнительный анализ функционирования АО и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ в митохондриях из побегов этиолированных проростков, этиолированных и зеленых листьев озимой пшеницы при закаливании к холоду; 4) оценить зависимость функционирования АО и НАД(Ф)·Н-ДГ II типа в митохондриях из листьев озимой пшеницы от условий освещенности и обеспеченности сахарами при действии низкой температуры; 5) представить возможные механизмы регуляции активности АО и НАД(Ф)·Н-ДГ II типа в митохондриях гетеротрофных и фотоавтотрофных растительных клеток.

Положения, выносимые на защиту

1. Интенсивность дыхания митохондрий в тканях озимой пшеницы определяется содержанием водорастворимых углеводов. От содержания водорастворимых углеводов в листьях независимо от типа ткани (фотоавто – или гетеротрофная) зависит функционирование альтернативной оксидазы, «внутренних» и «внешних» ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ как в контрольных условиях, так и при холодовом закаливании.

2. Альтернативная оксидаза и «внешняя» НАД·Н-дегидрогеназа участвуют в повышении морозоустойчивости озимой пшеницы. Одной из функций альтернативной оксидазы при низкой температуре является снижение уровня АФК.

3. Механизмы регуляции активности альтернативной оксидазы и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ в митохондриях озимой пшеницы при холодовом закаливании опосредуется влиянием света и доступностью субстратов для дыхания митохондрий.

Научная новизна. Изучено функционирование в изолированных митохондриях растений озимой пшеницы, выращенных в темноте и на свету, альтернативной оксидазы и НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ II типа, определено их участие в механизмах повышения морозоустойчивости и предложены возможные пути регуляции их активности при действии низких температур.

Установлено, что сахароза индуцирует синтез низкомолекулярных дегидринов (с мол. массами 18 и 24 кД) в листьях озимой пшеницы независимо от температуры обработки (контрольные условия или холодовое закаливание) и типа ткани (фотоавто- или гетеротрофная).

Показано, что при холодовом закаливании в побегах этиолированных проростков озимой пшеницы происходит увеличение содержания в митохондриях альтернативной оксидазы и снижение антимицин А-зависимой генерации АФК.

Впервые с использованием митохондрий, очищенных из этиолированных и зеленых листьев озимой пшеницы, выявлены сходства и различия в активности ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ в фотоавто- и гетеротрофных тканях растений. Показано, что функционирование альтернативной оксидазы и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ в митохондриях листьев зависит от углеводного статуса. Высокое содержание водорастворимых углеводов и высокая активность в митохондриях альтернативной оксидазы и «внешней»

НАД-Н-дегидрогеназы при действии низких температур являются одними из механизмов повышения морозоустойчивости озимой пшеницы.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные расширяют современные представления о механизмах функционирования и регуляции нефосфорилирующих путей транспорта электронов в дыхательной цепи митохондрий растений и роли митохондрий в процессах адаптации фотоавто- и гетеротрофных растительных клеток к низким температурам. Материалы диссертации могут быть использованы в образовательных и научно-исследовательских учреждениях по профилю рассматриваемой диссертации.

Связь работы с плановыми исследованиями и научными программами. Исследования проводились с 2011 по 2014 гг. в рамках тематических планов НИР лаборатории физиологической генетики СИФИБР СО РАН по проектам ФНИ VI.49.1.1 и VI.56.1.1, при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (№ 2012-1.1-12-000-2008-6400) (2012-2013 гг.) и гранта РФФИ (№12-04-16138_моб_з_рос) (2012 г.).

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 российских и международных съездах и конференциях, в том числе: FEBS Congress «Mechanisms in Biology» (St. Petersburg, 2013), FEBS EMBO Conference (Paris, 2014), VII Съезде Всероссийского общества физиологов растений (Нижний Новгород, 2011), 2-ой международной конференции «Генетика, геномика и биотехнология растений» (Иркутск, 2012), VI Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2012), Всероссийских научных конференциях «Факторы устойчивости растений в экстремальных природных условиях и техногенной среде» (Иркутск, 2013) и «Механизмы регуляции функций растительных органелл» (Иркутск, 2014), а также научных сессиях СИФИБР СО РАН (Иркутск 2012, 2014).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 17 научных работ, в том числе 7 статей в журналах из Перечня ВАК РФ.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов исследования, их обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 232 наименования, в том числе 178 на иностранном языке. Работа изложена на 178 страницах машинописного текста, содержит 37 рисунков и 4 таблицы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Обзор литературы

В разделе рассматриваются современные представления о процессах фотосинтеза и дыхания в клетках растений и влияние на эти процессы низкой температуры. Также представлены основные физиолого-биохимические механизмы адаптации растений к низким температурам, в том числе на уровне изменений липидной составляющей клеточных мембран, синтеза стрессовых белков и накопления криопротекторных соединений. Особое внимание уделяется роли митохондрий и альтернативных ферментов дыхания – ротенон-нечувствительных НАД(Ф)-Н-дегидрогеназ и альтернативной оксидазы в механизмах адаптации растений к низким температурам, а также роли этих белков в фотосинтезе и защите хлоропластов от фотоингибирования.

2. Объекты и методы

Объект исследования. В работе были использованы этиолированные проростки, этиолированные и зеленые растения озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Иркутская.

Для получения этиолированных проростков семена проращивали в кюветах на влажной фильтровальной бумаге в темноте при 25 ± 1 °С в течение 3 суток (К). Для получения этиолированных и зеленых растений пшеницы проросшие семена проращивали на полипропиленовой сетке в темноте или на свету. Этиолированные растения выращивали в темноте при 22 ± 1 °С, а зеленые – при $23/20 \pm 0,1$ °С (16 ч фотопериод) и освещенности $250 \text{ мкмоль}/(\text{м}^2 \cdot \text{с}^{-1})$ ФАР. Контрольные этиолированные растения использовали в возрасте 7,5 суток (К), а зеленые – в возрасте 9 суток (К).

Методы. Холодовое закаливание (Хол.зак) 3-х суточных этиолированных проростков проводили при 2 °С в течение 7 суток в темноте.

Для обработки сахарозой или/и низкой закаливающей температурой использовали 7-ми суточные этиолированные и зеленые растения озимой пшеницы (До обр). В работе использовали раствор 12 %-ой сахарозы (Туманов, 1979) и $\frac{1}{2}$ раствора Кнопа. Для обогащения сахарами в контрольных условиях (22 °С) растения помещали на раствор сахарозы, выдерживая их в темноте в течение 7 суток (К+Сах). Закаливание осуществляли в течение 7 суток. Этиолированные растения закаливали в темноте при 2 °С (Т) и в темноте при 2 °С на растворе сахарозы (Т+Сах). Зеленые растения пшеницы закаливали при следующих условиях: а) при $5/2$ °С (16 ч фотопериод) и освещенности $200 \text{ мкмоль}/(\text{м}^2 \cdot \text{с}^{-1})$ ФАР (Св(16)); б) при 5 °С (24 ч фотопериод) и освещенности $200 \text{ мкмоль}/(\text{м}^2 \cdot \text{с}^{-1})$ ФАР (Св(24)); в) в темноте при 2 °С (Т); и г) в темноте при 2 °С на растворе сахарозы (Т+Сах).

Для изучения ростовых процессов, содержания воды и сахаров использовали дополнительные контроли: для проростков – 10-ти суточные проростки, выращенные при 26 °С (К, 10), для этиолированных растений – 14-ти суточные растения, выращенные при 22 °С (К, 14), для зеленых – 14-ти суточные зеленые

растения, выращенные при $23/20 \pm 0,1$ °С (16 ч фотопериод) (контроль для закаленных на свету растений – К,14(Св)) и 14-ти суточные зеленые растения, выращенные 7 суток при $23/20 \pm 0,1$ °С (16 ч фотопериод) и 7 суток при 22 ± 1 °С в темноте (контроль для закаленных в темноте растений и растений, выращенных на сахарозе при 22 °С – К,14(Т)).

Для характеристики степени угнетения ростовых процессов, определяли степень ингибирования роста побегов (Иванов, 1974).

Относительную морозоустойчивость проростков и растений определяли по их отрастанию после ступенчатого промораживания (Самыгин, 1967). Анализировалась температура, вызывающая гибель 50% растений (LT_{50}), которую вычисляли на основе пробит-анализа.

Содержание водорастворимых углеводов определяли с использованием 0,2% антрона в концентрированной H_2SO_4 (Дише, 1967).

Выделение и очистку митохондрий из побегов этиолированных проростков проводили по методике (Грабельных и др., 2011). Выделение и очистку митохондрий из листьев зеленых и этиолированных растений осуществляли по методике (Боровик и др., 2013; Garmash et al., 2015).

Интактность внешней мембраны митохондрий рассчитывали по разнице скорости аскорбат-зависимого стимулируемого цитохромом с KCN-чувствительного поглощения кислорода (Шугаев и др., 2012) в отсутствие и в присутствии 0,04% Тритона X-100 (Davy de Virville et al., 1994).

Содержание хлорофилла в митохондриях определяли спектрофотометрически при 652 нм после экстракции 80% ацетоном по формуле Арнона (Arnon, 1949).

Окислительную и фосфорилирующую активность митохондрий определяли полярографически с платиновым электродом закрытого типа (электрод Кларка) на полярографах ОН-105 (“Radelkis”, Венгрия) и Oxytherm system (“Hansatech Inst.”, Англия) в ячейке объемом 1,4 мл при температуре 26 °С. Субстратами для дыхания служили: 10 мМ малат + 10 мМ глутамат, 8 мМ сукцинат + 5 мМ глутамат, 10 мМ глицин + 0,2 мМ НАД⁺, 1 мМ НАД·Н, 1 мМ НАДФ·Н. Глутамат добавляли для устранения оксалоацетатного ингибирования. Функционирование «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа оценивали по окислению малата в присутствии ингибитора комплекса I ЭТЦ 3 мкМ ротенона (Rot), функционирование «внешних» НАД·Н-ДГ или НАДФ·Н-ДГ – по окислению экзогенного НАД·Н или НАДФ·Н, соответственно, в присутствии ротенона и 0,06 мМ Ca^{2+} . Для ингибирования комплекса III ЭТЦ применяли 20 мкМ антимицин А (АнтА). Для ингибирования цитохромного пути (ЦП) использовали 0,4 мМ (митохондрии из проростков) и 1,2 мМ KCN (митохондрии из листьев), для ингибирования альтернативного пути (АП) – 1 мМ (митохондрии из проростков) и 3 мМ бензгидроксамовую кислоту (БГК) (митохондрии из листьев). Вклад ЦП рассчитывали как дыхание, ингибируемое KCN, а вклад АП, связанного с функционированием АО, рассчитывали как дыхание, ингибируемое БГК в присутствии KCN (потенциальная активность АО).

Содержание АФК в митохондриях определяли с помощью 2', 7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата (H₂DCF-DA) на спектрофлуорофотометре RF-5301 PC ("Shimadzu", Япония) (Грабельных и др., 2011).

Суммарный белок выделяли по методике (Побежимова и др., 2004). Митохондриальный белок выделяли по методике (Грабельных и др., 2014). Концентрацию белка определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1951).

Электрофорез проводили в 12,5% ПААГе с ДДС-Na в модифицированной системе (Laemmli, 1970), используя Mini-PROTEAN III Electrophoretic Cell ("Bio-Rad", США). Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану ("GE Healthcare", Швеция или "Sigma", США), используя Mini Trans-Blot ("Bio-Rad", США). Обработку антителами проводили согласно с рекомендациями фирмы-изготовителя. В работе использовали вторичные антитела, конъюгированные с щелочной фосфатазой. Порин (PORIN) использовали как внутренний контроль (Armstrong et al., 2008).

Во всех случаях проводили не менее 3-х независимых экспериментов, в каждом из которых повторность была 2-6 кратной. Данные представлены как средняя арифметическая или медиана, а разброс значений в виде стандартного отклонения или интерквартильной широты. Нормальность распределения проверялась с помощью критерия Шапиро-Уилки. Для доказательства наличия значимых различий между средними применяли однофакторный дисперсионный анализ с последующим множественным сравнением средних по методу Фишера (Гланц, 1998) или *H*-критерий Краскела-Уоллиса (Трухачева, 2012). Парное сравнение средних значений проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента или с использованием критерия Вилкоксона-Манна-Уитни (Гланц, 1998). Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p < 0,05$. В подписях к рисункам *n* означает количество независимых экспериментов. Статистические расчеты осуществляли с помощью SigmaPlot 12.5.

3. Результаты

3.1. Влияние холодого закаливания на параметры морозоустойчивости этиолированных проростков озимой пшеницы

Действие низкой положительной температуры 2 °С в течение 7 суток было эффективным для повышения морозоустойчивости 3-х суточных этиолированных проростков озимой пшеницы. Закаливание приводило к ингибированию роста, синтезу дегидринов и повышению выживаемости проростков после действия отрицательной температуры (рис. 1). Содержание сахаров при закаливании оставалось на высоком уровне (рис. 1б). Содержание дегидринов зависело от длительности закаливания, было незначительным в 1-е сутки и увеличивалось к концу закаливания (рис. 1в).

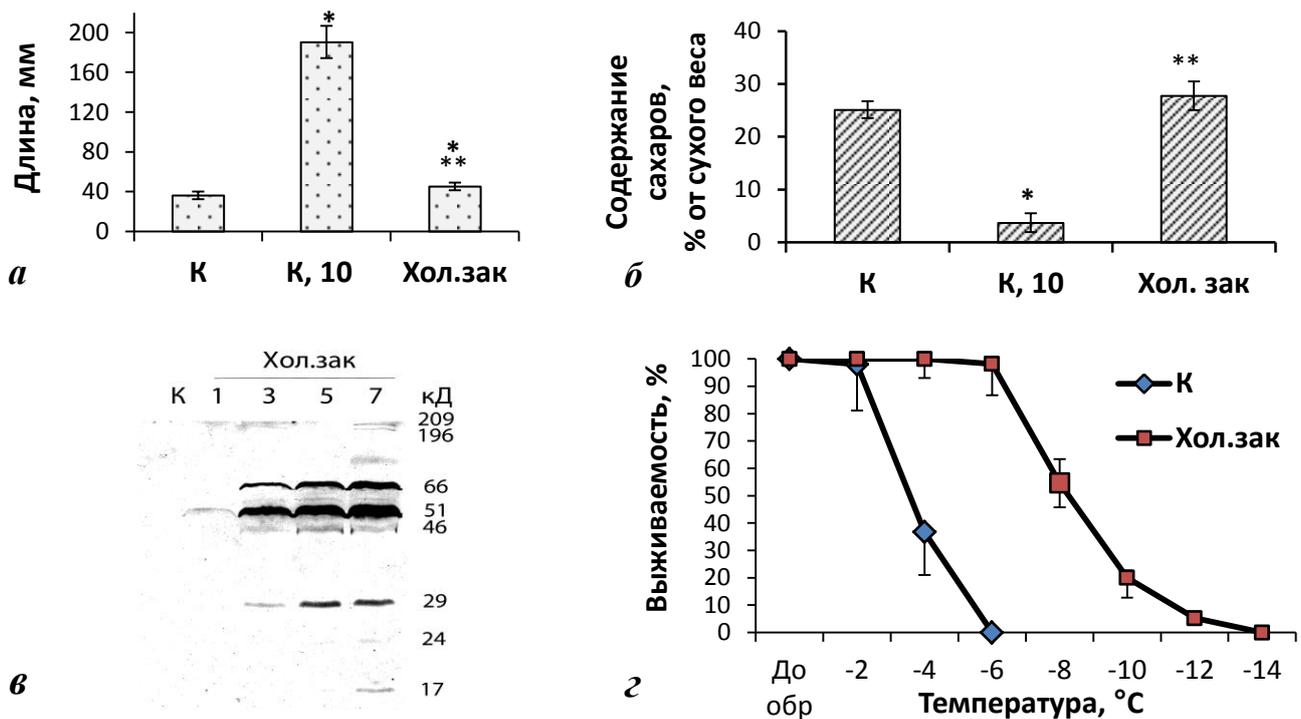


Рис. 1. Влияние холодого закаливания (Хол.зак) на рост побегов (*а*), содержание в побегах водорастворимых углеводов (*б*) и дегидринов (*в*), и морозоустойчивость (*г*) этилированных проростков озимой пшеницы.

Обозначения: К; К, 10; Хол.зак – см. «Объекты и методы»; До обр. – до промораживания; 1, 3, 5, 7 – сутки закаливания. $n=3-5$. *а, б* – $M \pm S.D.$, *г* – $Me[25\%;75\%]$. * – различия между «К» и исследуемым вариантом статистически значимы; ** – различия между «К,10» и исследуемым вариантом статистически значимы.

3.2. Влияние холодого закаливания на функциональную активность митохондрий из этилированных проростков озимой пшеницы

Холодое закаливание проростков озимой пшеницы сопровождалось снижением дыхания митохондрий и перераспределением дыхательных путей – ингибированием ЦП и увеличением вклада АП (при окислении сукцината и НАД·Н) (рис. 2*а*).

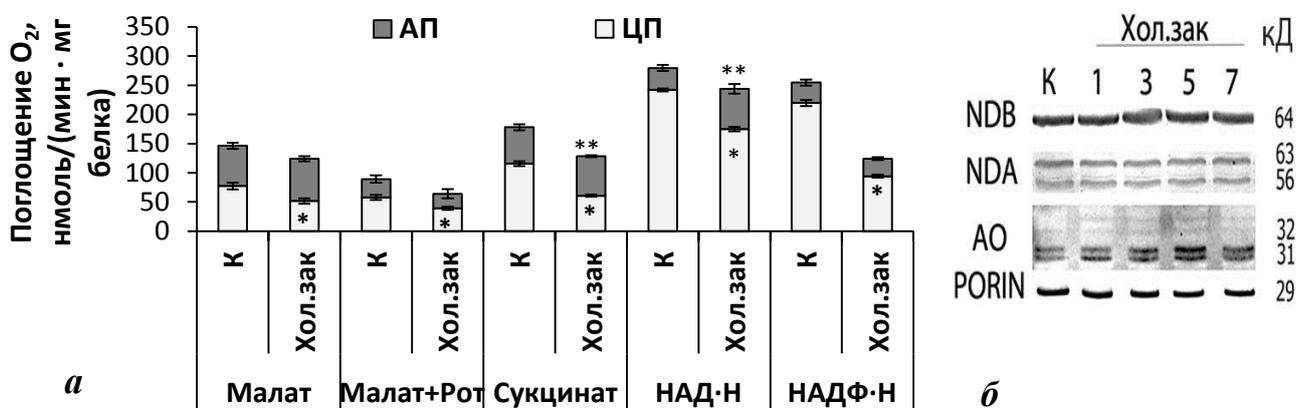


Рис. 2. Влияние холодого закаливания (Хол.зак) на дыхание митохондрий из этилированных проростков озимой пшеницы и вклад ЦП и АП (*а*) и содержание белков (*б*).

Обозначения: К; Хол.зак – см. «Объекты и методы». $n=3$. $M \pm S.D.$ * – различия между «К» и «Хол.зак» статистически значимы (для ЦП); ** – различия между «К» и «Хол.зак» статистически значимы (для АП).

Митохондрии сохраняли способность с высокой скоростью окислять экзогенный НАД·Н (высокая активность «внешней» НАД·Н-ДГ), что было сопряжено с увеличением вклада АО в дыхание (рис. 2а). Содержание АО и NDB в митохондриях при закаливании увеличивалось (рис. 2б).

Холодовое закаливание приводило к увеличению уровня АФК в митохондриях (рис. 3а). После холодового шока (-8°C, 6 ч) в митохондриях из закаленных проростков уровень АФК был гораздо ниже по сравнению с митохондриями из контрольных проростков (рис. 3а) (Грабельных и др., 2014). Добавление антимицина А или БГК к контрольным митохондриям повышало в них уровень АФК, в то время как в митохондриях закаленных проростков антимицин А не влиял, а БГК значительно усиливала генерацию АФК (рис. 3б).

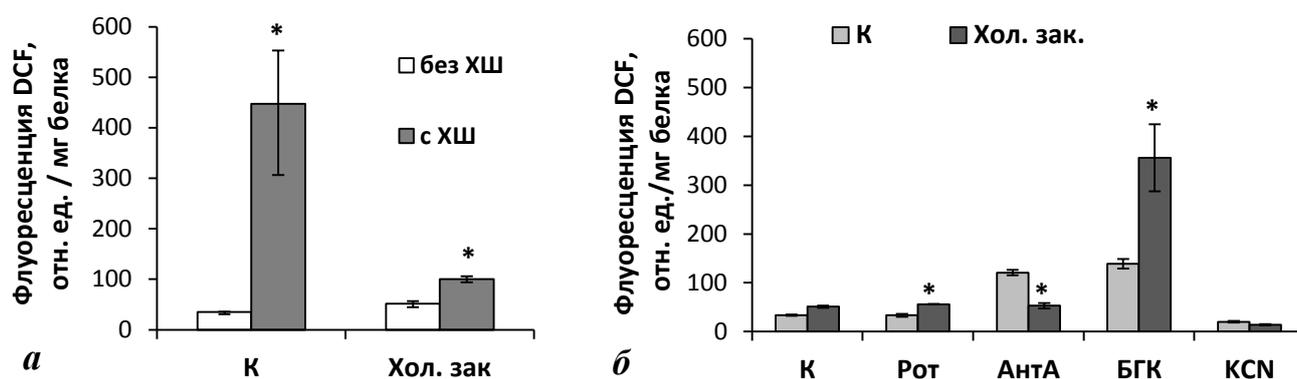


Рис. 3. Содержание АФК в митохондриях контрольных и закаленных проростков озимой пшеницы после холодового шока -8 °С, 6 ч (ХШ) (а) и влияние ингибиторов дыхательной цепи на образование АФК в митохондриях (б).

Обозначения: К, Хол.зак – см. «Объекты и методы»; б (ось абсцисс) – К – в отсутствие добавок. n=3-10. а – Me[25%;75%],* – различия между стрессированным и нестрессированным вариантом статистически значимы. б – M±S.D. * – различия между «К» и «Хол.зак» статистически значимы.

3.3. Параметры морозоустойчивости этиолированных и зеленых растений озимой пшеницы при холодовом закаливании и обработке сахарозой

Холодовое закаливание и обработка сахарозой приводили к увеличению морозоустойчивости этиолированных и зеленых растений озимой пшеницы (рис. 4а, бб) (Боровик и др., 2013, 2014; Боровик, 2014). Закаливание растений характеризовалось ингибированием роста, накоплением сахаров и синтезом дегидринов в листьях (рис. 4, 5, 6). При этом морозоустойчивость растений была связана с содержанием водорастворимых углеводов в листьях (рис. 4б, 5б).

Наиболее морозоустойчивыми были этиолированные растения, закаленные на сахарозе (рис. 4а), и зеленые растения, закаленные на непрерывном свете и в темноте на сахарозе (рис. бб). В зеленых листьях содержание сахаров зависело от условий закаливания и было наибольшим при закаливании в темноте на сахарозе и в условиях непрерывного освещения и наименьшим при закаливании в темноте (рис. 5б). В листьях этиолированных и зеленых растений выявлены дегидрины с мол. массами 18 и 24 кД, синтез которых имеет сахаро-зависимый характер (рис. 4в, ба).

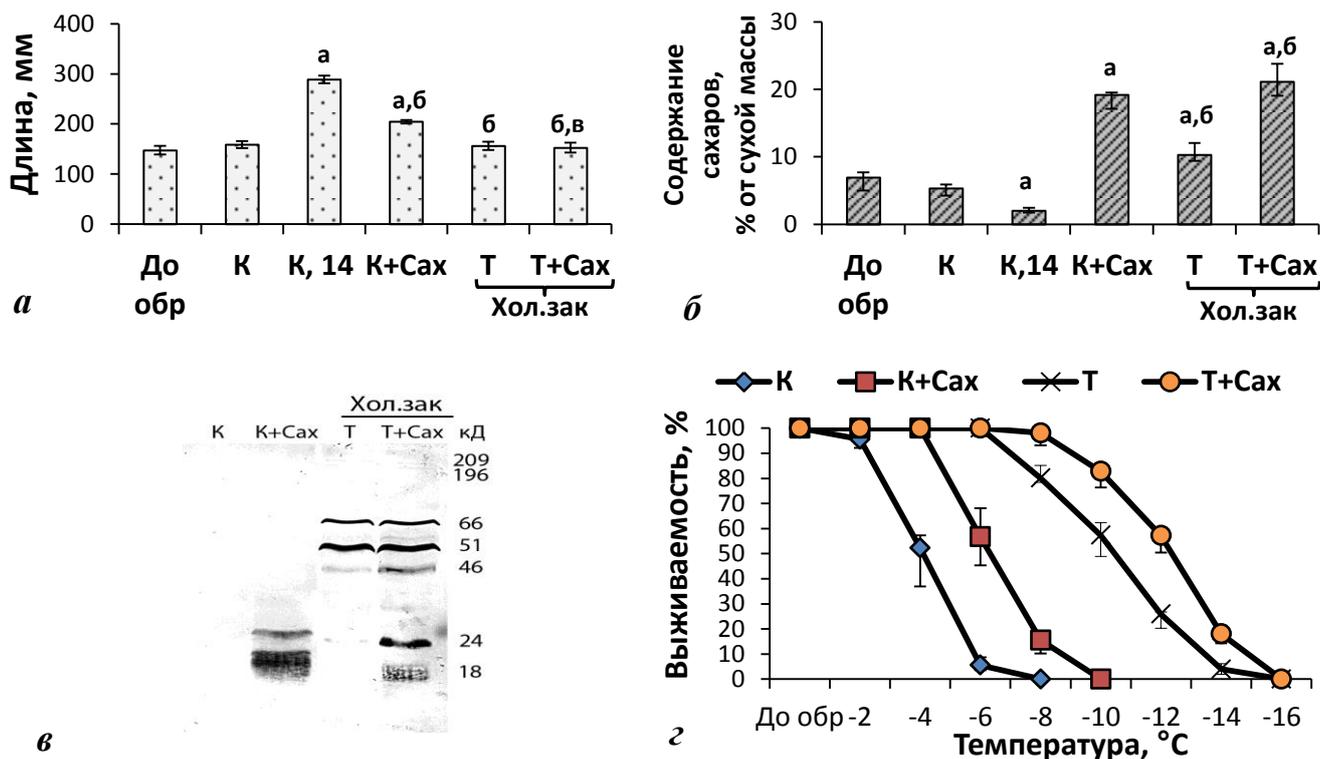


Рис. 4. Влияние холодого закаливания (Хол.зак) и экзогенной сахарозы (Сах) на рост побегов (*а*), содержание в листьях водорастворимых углеводов (*б*) и дегидринов (*в*), и морозостойчивость (*г*) этиолированных растений озимой пшеницы.

Обозначения: До обр (*а* и *б*); К; К, 14; К+Сах; Т; Т+Сах – см. «Объекты и методы»; До обр (*г*) – до промораживания. $n=3-8$. *а* – $M \pm S.D.$, *б*, *г* – $Me[25\%;75\%]$. ^a – различия между «К» и исследуемым вариантом статистически значимы; ^б – различия между «К,14» и исследуемым вариантом статистически значимы; ^в – различия между «К+Сах» и исследуемым вариантом статистически значимы.

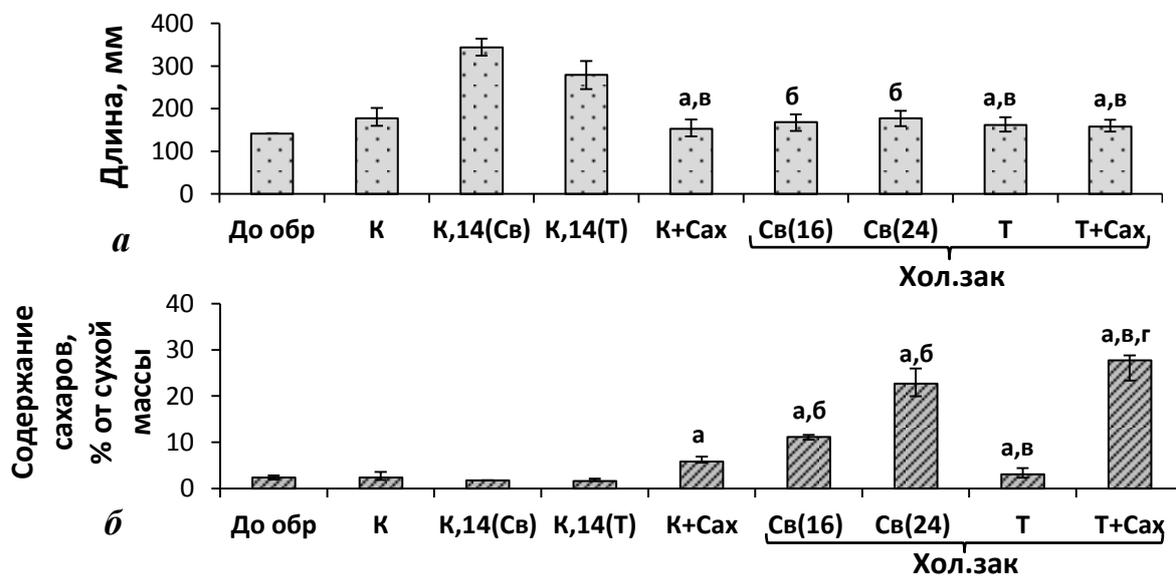


Рис. 5. Влияние холодого закаливания (Хол.зак) и экзогенной сахарозы (Сах) на рост побегов (*а*) и содержание в листьях водорастворимых углеводов (*б*) у зеленых растений озимой пшеницы.

Обозначения: До обр; К; К,14(Св); К,14(Т); К+Сах; Св(16); Св(24); Т; Т+Сах – см. «Объекты и методы»; $n=3-6$. $Me[25\%;75\%]$. ^a – различия между «К» и исследуемым вариантом статистически значимы, ^б – различия между «К,14(Св)» и исследуемым вариантом статистически значимы, ^в – различия между «К,14(Т)» и исследуемым вариантом статистически значимы, ^г – различия между «К+Сах» и исследуемым вариантом статистически значимы.

Экзогенная сахароза как в контрольных условиях, так и при действии низкой температуры увеличивала активность АО в митохондриях из этиолированных листьев при окислении всех субстратов, за исключением малата в присутствии ротенона (рис. 7а,б). Однако наибольшее увеличение потенциальной активности АО наблюдали при выращивании этиолированных растений на сахарозе в контрольных условиях (рис. 7а,б). Содержание АО и NDA с мол. массой 56 кД при закаливании на сахарозе увеличивалось (рис. 7в,д).

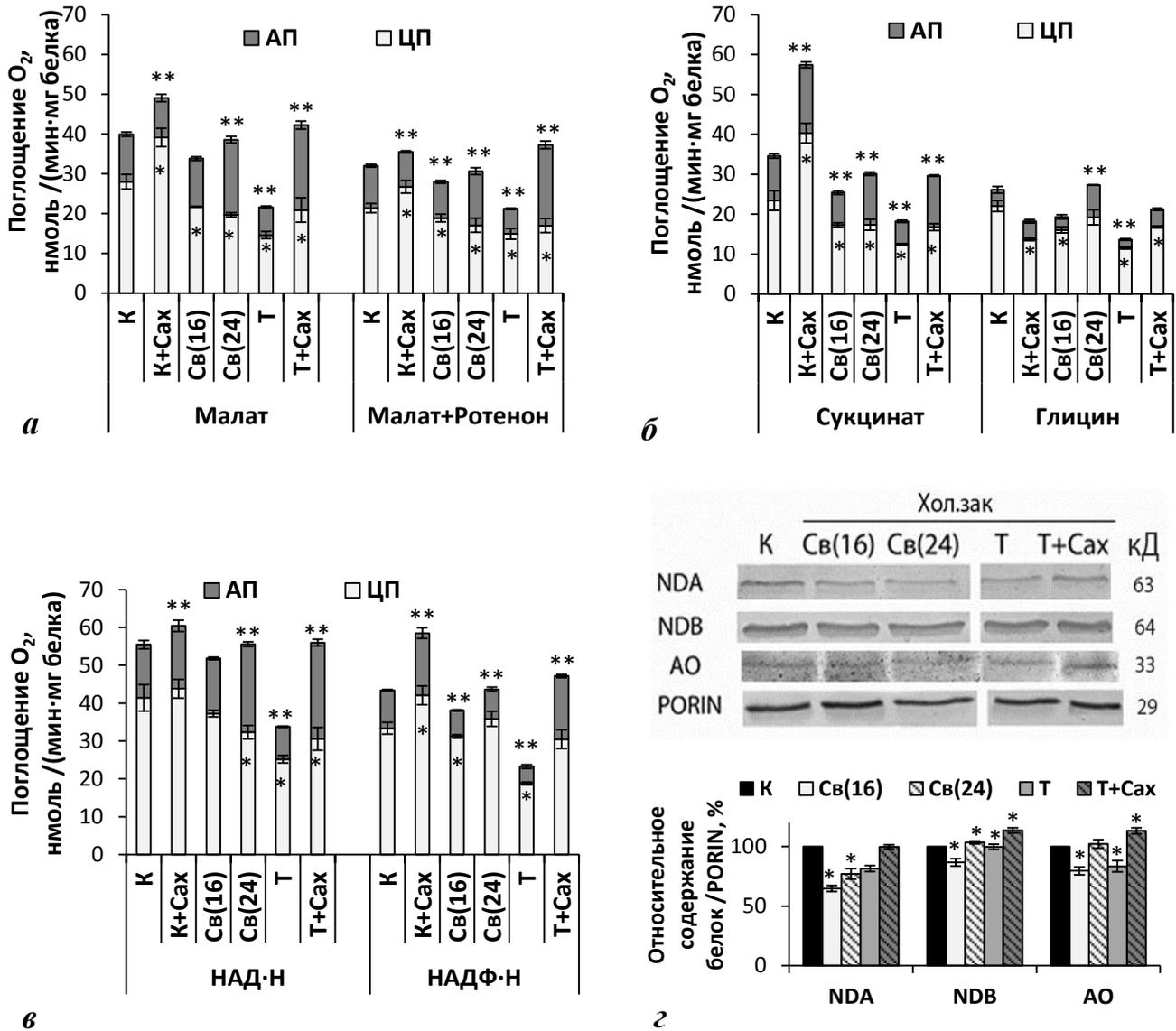


Рис. 8. Влияние экзогенной сахарозы (Сах) и холодового закаливания (Хол.зак) на дыхание митохондрий из зеленых листьев и вклад ЦП и АП (а,б,в) и содержание белков (z).

Обозначения: К, К+Сах, Св(16), Св(24), Т, Т+Сах – см. «Объекты и методы». $n=3-6$. $M \pm S.D.$ * – различия между «К» и исследуемым вариантом статистически значимы (для ЦП); ** – различия между «К» и исследуемым вариантом статистически значимы (для АП).

Увеличение потенциальной активности АО в митохондриях (при окислении определенных субстратов) из зеленых листьев наблюдали при выращивании и закаливании растений в темноте на сахарозе и при закаливании на непрерывном свете (рис. 8а,б,в). Выращивание зеленых растений на сахарозе приводило к увеличению потенциальной активности АО при окислении сукцината, НАД·Н и

НАДФ·Н (рис. 8а,б,в). В то же время закаливание растений на сахарозе сопровождалось значительным повышением активности АО при окислении митохондриями всех используемых субстратов, кроме глицина (рис. 8). Закаливание растений при 24 ч фотопериоде приводило к увеличению активности АО в митохондриях при окислении малата, малата в присутствии ротенона, сукцината, глицина и НАД·Н (рис. 8а,б,в). Особенно значительным можно считать увеличение в этих условиях активности АО при окислении глицина по сравнению с контролем (рис. 8г). Закаливание растений при 16 ч фотопериоде при окислении малата, сукцината и глицина не влияло на активность АО, в то время как закаливание в темноте независимо от субстрата окисления приводило к снижению ее активности (рис. 8а,б,в).

Активность «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа в митохондриях из зеленых листьев увеличивалась при выращивании растений на сахарозе независимо от температурного режима (рис. 8а). Однако, если при закаливании на сахарозе их функционирование было связано с АП, то в контрольных условиях – с ЦП. При закаливании в темноте и при 16 ч фотопериоде активность «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа снижалась, однако при 24 ч фотопериоде не изменялась. Стоит отметить, что функционирование «внутренних» ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-ДГ в митохондриях при закаливании в условиях непрерывного освещения было сопряжено с активностью АО (рис. 8а).

Активность «внешних» НАД(Ф)·Н-ДГ увеличивалась при выращивании растений на сахарозе как в контрольных условиях, так и при закаливании (рис. 8в). Закаливание проростков в темноте на сахарозе приводило к увеличению содержания в митохондриях АО (рис. 8г). Содержание NDB в митохондриях после закаливания значительно не изменялось (за исключением закаливания на сахарозе), в то время как содержание NDA снижалось (за исключением закаливания на сахарозе) (рис. 8г).

4. Обсуждение

4.1. Общие механизмы и особенности формирования морозоустойчивости этиолированных и зеленых растений озимой пшеницы

Независимо от типа ткани (фотоавто- или гетеротрофная) и условий закаливания низкая температура приводила к ингибированию роста побегов проростков и растений озимой пшеницы (рис. 1а, 4а, 5а), синтезу дегидринов (рис. 1в, 4в, 6а) и повышению морозоустойчивости (рис. 1г, 4г, 6б). Содержание сахаров при закаливании не изменялось в проростках (оставалось на высоком уровне) (рис. 1б) и увеличивалось в листьях этиолированных и зеленых растений (рис. 4б, 5б). С увеличением длительности светового периода при закаливании зеленых растений накопление сахаров в листьях возрастало (рис. 3б). Морозоустойчивость закаленных этиолированных проростков, этиолированных и зеленых растений озимой пшеницы была связана с содержанием сахаров в листьях и проростках.

Низкая температура независимо от типа ткани и светового режима закаливания индуцировала синтез как высоко-, так и низкомолекулярных

дегидринов (рис. 1в, 4в, 6а). Дегидрины – многофункциональные белки, которые обнаружены в различных компартментах растительной клетки, и их синтез значительно индуцируется действием факторов, приводящих к обезвоживанию (Rorat, 2006; Kosová et al., 2010; Nanin et al., 2011). Сахароза индуцировала синтез дегидринов с мол. массами 18 и 24 кД как в листьях этиолированных, так и зеленых растений (рис. 4в, 6а). Поскольку в этих условиях повышалась морозоустойчивость растений (рис. 4г, 6б), можно говорить о защитной роли индуцированных сахарозой дегидринов. Таким образом, накопление водорастворимых углеводов, ингибирование роста и синтез дегидринов являются механизмами, необходимыми для повышения морозоустойчивости растений как с гетеротрофным, так и фотоавтотрофным типом метаболизма.

Наибольшее содержание сахаров в зеленых листьях наблюдалось при закаливании растений в условиях непрерывного освещения, что свидетельствует о сохранении высокой фотосинтетической активности хлоропластов при действии низкой температуры. Снижение фотоингибирования при избыточном освещении может быть обусловлено активацией альтернативных ферментов ЭТЦ митохондрий – АО и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-ДГ (Finnegan et al., 2004; Noguchi, 2005; Zhang et al., 2010; Xu et al., 2011; Florez-Sarasa et al., 2011). Вероятно, при действии низких температур наблюдается сходная ситуация: происходит активация АО и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ, которые защищают фотосинтетический аппарат хлоропластов от фотоингибирования в условиях низкотемпературного стресса.

4.2. Роль альтернативных ферментов дыхания в метаболизме гетеротрофных и фотоавтотрофных клеток растений при холодовом закаливании

Известно, что низкая температура активировала АО и «внешние» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа (Elhafez et al., 2006; Mizuno et al., 2008). Холодовое закаливание этиолированных проростков и растений в темноте хотя и приводило к снижению скорости дыхания в митохондриях (рис. 2а, 7а,б), но это снижение было не таким значительным как снижение, которое наблюдали в митохондриях из зеленых растений, закаленных в темноте (рис. 8а,б,в). Одним из объяснений полученных результатов является более высокий уровень водорастворимых углеводов в тканях побегов этиолированных проростков и растений по сравнению с зелеными (рис. 1б, 4б, 5б). Действительно, в условиях закаливания зеленых растений озимой пшеницы в темноте на сахарозе или при непрерывном освещении, когда содержание сахаров в тканях было намного выше, чем при закаливании в темноте (рис. 5б), снижение интенсивности дыхания либо не наблюдали, либо оно было незначительным (рис. 8а,б,в).

Независимо от типа ткани (этиолированные побеги и листья или зеленые листья) выявлена важная роль АО и «внешней» НАД·Н-ДГ в поддержании функциональной активности митохондрий озимой пшеницы при низких температурах (рис. 2а, 7б, 8в). Обращает на себя внимание высокая потенциальная активность АО и высокая скорость окисления экзогенных НАД·Н и НАДФ·Н в митохондриях из листьев озимой пшеницы независимо от типа

ткани, что свидетельствует о важной функциональной роли АО и «внешних» НАД(Ф)·Н-ДГ в метаболизме как гетеротрофных, так и фотосинтезирующих растений (рис. 7б, 8в).

Одной из функций АО при закаливании может быть снижение образования АФК. Индукция АФК под действием антимицина А и гидроксамовых кислот в контрольных условиях была показана ранее на различных растительных объектах (Maxwell et al., 1999; Попов и др., 2003; Hammes et al., 2005; Strodtkötter et al., 2009; Dinakar et al., 2010). Нами показано, что в митохондриях из закаленных проростков озимой пшеницы антимицин А не вызывает генерацию АФК, а БГК еще больше ее усиливает по сравнению с митохондриями контрольных проростков (рис. 3б) (Грабельных и др., 2011). Поскольку при закаливании активность и содержание АО в митохондриях возрастает, по-видимому, благодаря антиоксидантной функции АО значительного образования АФК в митохондриях после холодового шока не происходило (рис. 3а).

Окисление НАД·Н митохондриями из этиолированных проростков озимой пшеницы в меньшей мере зависит от действия низкой температуры, чем окисление НАДФ·Н (рис. 2а). На основании этих данных можно предполагать, что «внешняя» НАД·Н-ДГ, но не «внешняя» НАДФ·Н-ДГ, играет важную роль в поддержании функционального состояния митохондрий в гетеротрофных тканях растений при действии низких температур (Грабельных и др., 2014). Подобное предположение ранее высказывалось и другими авторами (Fredlund et al., 1991; Zottini et al., 1993). В дальнейшем оказалось, что окисление НАД·Н и НАДФ·Н, а также активность АО, в митохондриях закаленных этиолированных и зеленых растений озимой пшеницы зависят в большей степени от содержания сахаров в тканях. Это хорошо видно на примере митохондрий из зеленых листьев закаленных растений – чем выше было содержание сахаров, тем выше была активность АО и «внешних» НАД(Ф)·Н-ДГ (рис. 5б, 8в). Активность АО повышалась и при окислении малата в присутствии ротенона (когда функционируют «внутренние» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа) в митохондриях из зеленых растений после их закаливания в темноте на сахарозе и при закаливании в условиях непрерывного освещения (рис. 8а).

Полученные данные свидетельствуют об участии АО и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-ДГ в ответной реакции митохондрий озимой пшеницы на низкую температуру. Рассеивание избытка восстановительных эквивалентов от хлоропластов через альтернативные ферменты дыхания, возможно, предотвращает развитие окислительного стресса в хлоропластах при низкой температуре и, таким образом, обеспечивает эффективную работу фотосинтетического аппарата и накопление сахаров. Действительно, при закаливании озимой пшеницы в условиях непрерывного освещения происходило значительное накопление водорастворимых углеводов в листьях (рис. 5б) и активация АО при окислении малата, малата в присутствии ротенона, глицина и экзогенного НАД·Н (рис. 8а,б,в). Активность НАД(Ф)·Н-ДГ II типа при этом поддерживалась на высоком уровне (рис. 8а,в). Ротенон-нечувствительные НАД(Ф)·Н-ДГ могут играть важную роль в окислении НАД(Ф)·Н при низких

температурах, поскольку их функционирование при закаливании зеленых растений озимой пшеницы в условиях непрерывного освещения остается высоким и более того, сопряженным с функционированием АО (рис. 8а,в). Таких изменений не наблюдали при закаливании зеленых растений в темноте и при 16 ч фотопериоде (рис. 8а,б,в). Высокое содержание углеводов при закаливании в условиях непрерывного освещения свидетельствует об эффективной работе фотосинтетического аппарата в этих условиях. Активация АО при окислении митохондриями глицина указывает на важную роль данного фермента в поддержании реакций фотодыхания в условиях низких температур.

Таким образом, функционирование АО и НАД(Ф)·Н-ДГ II типа в митохондриях озимой пшеницы при закаливании к холоду связано с необходимостью регуляции образования АФК, регуляции соотношения $[\text{НАД(Ф)·Н}/\text{НАД(Ф)}^+]$ и поддержании работы ферментов гликолиза, цикла Кребса и ПФП, а также поддержании фотосинтетических реакций. Сопряженное с АО функционирование ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-ДГ в митохондриях является одним из механизмов более эффективного повышения морозоустойчивости озимых злаков.

4.3. Возможные механизмы регуляции альтернативной оксидазы и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ в гетеротрофных и фотосинтезирующих клетках растений при холодовом закаливании

В работе изучена возможность регуляции АО и НАД(Ф)·Н-ДГ II типа в митохондриях озимой пшеницы углеводным статусом, низкой температурой и условиями освещенности. Чтобы выяснить роль сахаров в регуляции активности АО и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-ДГ был применен методологический подход, заключающийся в обогащении растений сахарами путем их выращивания на растворе 12%-ой сахарозы (Туманов, 1979), а также закаливание в присутствии сахарозы и при различном световом режиме. При выращивании этиолированных и зеленых растений озимой пшеницы на сахарозе происходил рост морозоустойчивости растений и значительная активация АО при окислении всех используемых субстратов, за исключением глицина и малата в присутствии ротенона (рис. 4б, 5б, 7а,б, 8а,б,в). В этих условиях выращивания отмечено и повышение активности «внешних» и «внутренних» ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-ДГ независимо от типа ткани (рис. 7а,б, 8а,б,в). При этом функционирование «внешних» НАД(Ф)·Н-ДГ было сопряжено с повышенной активностью АО. Полученные данные позволяют сделать заключение о сахарозависимой регуляции активности изучаемых систем. Из литературы известно о связи между активностью АО в интактных тканях и содержанием водорастворимых углеводов (Azcón-Bieto et al., 1983). Изменение углеводного статуса может влиять на активность АО и НАД(Ф)·Н-ДГ II типа через изменения уровня субстратов дыхания, интермедиатов цикла Кребса, НАД·Н и НАДФ·Н в митохондриях и степени восстановленности убихинолового пула (Finnegan et al., 2004; Rasmusson et al., 2004; Geisler et al., 2007; Vanlerberghe, 2013). Помимо регуляции активности альтернативных ферментов дыхания субстратами дыхания

существуют данные о сахаро-зависимой регуляции генов этих ферментов (Elhafez et al., 2006).

Как оказалось, механизм сахаро-зависимой регуляции АО и НАД(Ф)·Н-ДГ II типа в митохондриях озимой пшеницы сохраняется и при действии низкой температуры. Закаливание как этиолированных, так и зеленых растений озимой пшеницы на сахарозе приводило к увеличению вклада АО в дыхание при окислении практически всех субстратов (рис. 7а,б, 8а,б,в). Независимо от типа ткани активность «внешней» НАДФ·Н-ДГ в этих условиях возрастала, в то время как активность «внешней» НАД·Н-ДГ не изменялась (рис. 7б, 8в). В отличие от «внешних» НАД(Ф)·Н-ДГ, функционирование «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа зависело от типа ткани: в митохондриях из этиолированных листьев их активность не изменялась, а в митохондриях из зеленых листьев увеличивалась (рис. 7а, 8а). Увеличение активности «внешних» и «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ в митохондриях из зеленых листьев после закаливания на сахарозе было сопряжено с повышением вклада АП в дыхание (рис. 8а,в). В митохондриях из этиолированных листьев повышенный вклад АП в дыхание наблюдали только при функционировании «внешних» НАД(Ф)·Н-ДГ (рис. 7б). Поскольку при низких температурах происходит увеличение содержания не только водорастворимых углеводов (Трунова, 2007), но и АФК, АБК и Ca^{2+} (Monroy and Dhindsa, 1995; Suzuki and Mittler, 2006; Kosová et al., 2012) не исключена возможность участия этих агентов в регуляции активности АО и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-ДГ при низкой температуре.

Известно, что экспрессия генов *NDA1* и *NDC1* и *AOX1a* имеет свето-зависимую регуляцию (Escobar et al., 2004; Elhafez et al., 2006). Использование различных фотопериодов (0, 16 и 24 ч фотопериоды) при закаливании позволило оценить связь между содержанием сахаров и активностью альтернативных ферментов дыхания. Чем меньше была длительность освещения во время закаливания, тем меньше накапливалось сахаров в листьях (рис. 5а), ниже была скорость окисления субстратов дыхания и ниже был вклад АО в дыхание (рис. 8а,б,в).

Высокая концентрация АТФ и НАД·Н на свету ограничивает поток электронов в цикл Кребса (Hurry et al., 2005), что более выражено при действии низкой температуры в условиях непрерывного освещения и, возможно, именно это является причиной высокой активности ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-ДГ и активации АО (рис. 8а,в). Уровень НАД·Н в митохондриях и его увеличение на свету связаны с увеличением уровня восстановленного НАДФ·Н. В митохондриях на свету НАД·Н образуется в результате работы глициндекарбоксилазы фотодыхания или транспортируется через малат/оксалоацетатный шунт (Krömer and Heldt, 1995). Образование НАДФ·Н в митохондриях может быть достигнуто через транс-гидратацию между НАД·Н и НАДФ⁺ (Vykova and Møller, 2001). Увеличенный уровень НАДФ·Н может приводить к активации АО (вероятно, через систему глутатиона и тиоредоксина) (Noguchi, 2005; Ribas-Carbo et al., 2005) и «внутренней» НАДФ·Н-ДГ (Vykova et

al., 1998; Vukova and Møller, 2001), что, вероятно, имеет место и при низкой температуре (рис. 8а,б,в).

Совокупность полученных результатов указывает на то, что свет играет важную роль в регуляции активности АО и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ в митохондриях озимой пшеницы, однако при холодовом закаливании растений функционирование этих систем регулируется как световым режимом, так и доступностью субстратов для дыхания митохондрий. Распределение потока электронов от «внешней» НАДФ·Н-ДГ через ЦП или АП при холодовом закаливании в условиях доступности субстратов дыхания регулируется световым режимом. При холодовом закаливании в темноте на сахарозе как этиолированных, так и зеленых листьев транспорт электронов от «внешней» НАДФ·Н-ДГ осуществляется через АП, а при закаливании зеленых листьев в условиях непрерывного освещения – через ЦП. Это предполагает наличие различных механизмов, регулирующих транспорт электронов с «внешней» НАДФ·Н-ДГ на АП или ЦП. Следует также отметить, что в отличие от «внешней» НАДФ·Н-ДГ при закаливании на непрерывном свете функционирование «внешней» НАД·Н-ДГ было сопряжено с работой АП (рис. 8в). Вероятно, на свету «внешние» НАД·Н и НАДФ·Н-ДГ могут конкурировать друг с другом или взаимодополнять друг друга, поддерживая энергетику дыхания митохондрий в стрессовых условиях.

Полученные в работе результаты свидетельствуют о связи между углеводным статусом и активностью АО и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-ДГ в митохондриях озимой пшеницы при холодовом закаливании. При этом активность альтернативных ферментов дыхания при низкой температуре регулируется повышенным потоком субстратов дыхания независимо от типа ткани. Повышенное функционирование АО и высокая активность «внешних» НАД(Ф)·Н-ДГ в митохондриях в условиях действия низких закаливающих температур на свету, вероятно, способствует поддержанию фотосинтетической активности хлоропластов и повышению устойчивости растений озимой пшеницы к низким температурам. Следует отметить, что выявленные в работе механизмы регуляции активности АО при действии низкой температуры на растения основаны на изучении потенциальной активности этого фермента, которая выявляется при ингибировании или ограничении потока электронов через основной цитохромный путь. В связи с этим наши данные указывают на важную роль альтернативных ферментов дыхания в ответной реакции растений на низкую температуру. Функционирование АО и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-ДГ обеспечивает пластичность работы дыхательной цепи митохондрий при действии низких температур, поддерживает работу клеточного дыхания, регулируя не только активность НАД⁺-зависимых ферментов и соотношение [НАД(Ф)⁺]/[НАД(Ф)·Н], но и энергетический баланс клетки в целом.

ВЫВОДЫ

1. Накопление водорастворимых углеводов, синтез дегидринов и высокая активность в митохондриях альтернативной оксидазы и «внешней» НАД·Н-дегидрогеназы являются одними из факторов повышения морозоустойчивости озимой пшеницы при холодовом закаливании.

2. Сахароза индуцирует синтез низкомолекулярных дегидринов с мол. массами 18 и 24 кД в листьях озимой пшеницы независимо от температуры обработки (контрольные условия или холодовое закалывание) и типа ткани (фотоавто- или гетеротрофная).

3. Содержание водорастворимых углеводов в тканях озимой пшеницы определяет интенсивность дыхания митохондрий. От содержания водорастворимых углеводов в этиолированных и зеленых листьях зависит функционирование альтернативной оксидазы, «внутренних» и «внешних» ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ как в контрольных условиях, так и при холодовом закаливании. Чем больше содержание сахаров в листьях, тем выше активность альтернативных ферментов дыхания.

4. Цианид-резистентное дыхание участвует в поддержании функциональной активности митохондрий озимой пшеницы при низких температурах независимо от типа ткани (фотоавто – или гетеротрофная). Альтернативная оксидаза играет важную роль при окислении глицина митохондриями в листьях зеленых растений при закаливании в условиях непрерывного освещения.

5. В гетеротрофных тканях озимой пшеницы увеличение содержания альтернативной оксидазы в митохондриях при холодовом закаливании сопровождается снижением антимицин-А-индуцируемой генерации АФК, что свидетельствует о возможной антиоксидантной роли альтернативной оксидазы.

6. Свет играет важную роль в регуляции активности альтернативной оксидазы и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ в митохондриях озимой пшеницы. В фотоавтотрофных тканях окисление малата является почти полностью ротенон-нечувствительным, что свидетельствует о высокой активности «внутренних» ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ. При холодовом закаливании растений функционирование альтернативной оксидазы и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ регулируется как световым режимом выращивания, так и доступностью субстратов для дыхания митохондрий.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в периодических изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Антиоксидантная функция альтернативной оксидазы в митохондриях озимой пшеницы при холодовом закаливании / О.И. Грабельных, Т.П. Побежимова, Н.С. Павловская, Н.А. Королева, **О.А. Боровик**, И.В. Любушкина, В.К. Войников // Биологические мембраны. – 2011. – Т. 28, № 4. – С.274–283.

2. Участие цианидрезистентного дыхания в термогенерации и антиокислительной защите клетки в проростках озимой пшеницы при холодовом воздействии / О.И. Грабельных, Т.П. Побежимова, А.М. Корзун, С.А. Возненко, Н.А. Королева, Н.С.

Павловская, **О.А. Боровик**, В.К. Войников / Журнал стресс-физиологии и биохимии. – 2011. – Т.7, №4. – С. 446–456.

3. Связь между активностью альтернативного пути дыхания, содержанием сахаров и морозоустойчивостью озимой пшеницы / **О.А. Боровик**, О.И. Грабельных, Н.А. Королева, Т.П. Побежимова, В.К. Войников // Журнал стресс-физиологии и биохимии. – 2013. – Т. 9, № 4. – С. 241–250.

4. **Боровик О.А.** Альтернативные ферменты дыхательной цепи митохондрий принимают участие в развитии морозоустойчивости озимой пшеницы / О.А. Боровик // В мире научных открытий. – 2014. – № 8(56). – С. 7–21.

5. 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, **О.А. Боровик**, Н.С. Павловская, И.В. Любушкина, Н.А. Королева, В.К. Войников // Биологические мембраны. – 2014. – Т. 31, № 3. – С. 204–217.

6. Митохондриальные энерго-рассеивающие 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, Т.П. Побежимова, А.И. Катышев, Н.С. Павловская, Н.А. Королева, И.В. Любушкина, В.Ю. Башмаков, В.Н. Попов, Г.Б. Боровский, В.К. Войников // Биохимия. – 2014. – Т. 79, вып. 6. – С. 647–662.

7. Влияние углеводного статуса и низкой температуры на дыхательный метаболизм митохондрий из этиолированных листьев озимой пшеницы / **О.А. Боровик**, О.И. Грабельных, Н.А. Королева, Т.П. Побежимова, В.К. Войников // Журнал стресс-физиологии и биохимии. – 2014. – Т. 10, № 4. – С. 118–130.

Статьи в других изданиях и материалах конференций

8. Изменение жирнокислотного состава липидов митохондрий озимой пшеницы в процессе холодового закаливания и последующего действия отрицательной температуры / О.И. Грабельных, Т.П. Побежимова, К.А. Кириченко, **О.А. Боровик**, Н.С. Павловская, Н.А. Королева, Н.А. Соколова, В.К. Войников // VII Съезда Общества физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» и «Инновации в биологии для развития биоиндустрии сельскохозяйственной продукции». Материалы докладов (в двух частях). Ч.1. – Нижний Новгород, 2011. – С. 197–198.

9. **Боровик О.А.** Изменение жирнокислотного состава липидов и содержания активных форм кислорода в митохондриях озимой пшеницы при холодовом закаливании и действии отрицательной температуры / О.А. Боровик, О.И. Грабельных, Т.П. Побежимова // Вестник Иркутского университета. – Иркутск: Изд-во ИГУ, 2011. – вып. 14. – С. 35–36.

10. **Боровик О.А.** Функционирование энерго-рассеивающих систем в митохондриях озимой пшеницы в условиях низких заливающих температур / О.А. Боровик, О.И. Грабельных, Т.П. Побежимова // Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой : Материалы VI Всероссийская конференция молодых ученых. – Саратов: Научная книга, 2012. – С. 59.

11. The changes of gene expression, protein content and alternative and cytochrome pathways capacity in the winter wheat mitochondria under cold hardening / О.И. Grabelnych, **О.А. Borovik**, Т.Р. Pobezhimova, Е.Л. Tauson, N.S. Pavlovskaya, N.A.

Koroleva, A.I. Katyshev, I.V. Lyubushkina, D.N. Fedorin, V.N. Popov, G.B. Borovskii, V.K. Voinikov // Plant genetics, genomics, and Biotechnology. Proceedings of the 2nd International Conference. – Irkutsk, Russia, 2012. – P. 34.

12. **Боровик О.А.** Роль света в регуляции активности альтернативной оксидазы и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ митохондрий при холодовом закаливании озимой пшеницы / О.А. Боровик, О.И. Грабельных, Н.А. Королева, Т.П. Побежимова // Факторы устойчивости растений в экстремальных природных условиях и техногенной среде: Материалы всероссийской научной конференции. – Иркутск: СИФИБР СО РАН, 2013. – С. 39–42.

13. Грабельных О.И. Митохондриальные энергорассеивающие системы растений при действии низких температур / О.И. Грабельных, **О.А. Боровик**, Т.П. Побежимова, В.К. Войников // Там же. – С. 63–65.

14. **Боровик О.А.** Связь морозоустойчивости растений с содержанием сахаров и активностью альтернативной оксидазы митохондрий / О.А. Боровик // Молодежь и наука на Севере : Материалы докладов II Всероссийской (XVII) молодежной научной конференции, Т. I. – Сыктывкар: Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, 2013. – С. 13–14.

15. Activities of alternative oxidase, uncoupling proteins and adenine nucleotide translocator in winter wheat mitochondria during cold hardening / O. Grabelnych, **O. Borovik**, I. Lyubushkina, T. Pobezhimova, V. Voinikov // FEBS Journal. – 2013. – V. 280, Suppl. 1. – P. 522.

16. **Боровик О.А.** Роль света и низкой температуры в регуляции активности альтернативной оксидазы и НАД(Ф)Н-дегидрогеназ II типа в митохондриях озимой пшеницы / О.А. Боровик, О.И. Грабельных, Н.А. Королева, Т.П. Побежимова // Механизмы регуляции функций растительных органелл : Материалы Всероссийской научной конференции. – Иркутск: НЦРВХ СО РАН, 2014. – С. 9–11.

17. Fatty acid composition and functional state of mitochondria from hardened and unhardened winter wheat seedlings after a cold shock / O. Grabelnych, K. Kirichenko, **O. Borovik**, T. Pobezhimova, N. Zabanova, I. Lyubushkina, N. Koroleva, V. Voinikov // FEBS Journal. – 2014. – V. 281, Suppl. 1. – P. 563.

Список сокращений

АО – альтернативная антимицин А- и цианид-резистентная оксидаза

АП – альтернативный путь дыхания, связанный с функционированием АО

НАД(Ф)Н-ДГ II типа – митохондриальные ротенон-нечувствительные НАД(Ф)Н-дегидрогеназы

ЦП – цитохромный путь дыхания, связанный с функционированием цитохромоксидазы

NDA – «внутренние» ротенон-нечувствительные НАД(Ф)Н-дегидрогеназы

NDB – «внешние» ротенон-нечувствительные НАД(Ф)Н-дегидрогеназы