

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

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

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

**Научный руководитель:
доктор биологических наук, доцент
Грабельных Ольга Ивановна**

Иркутск – 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПРОЦЕССАХ ФОТОСИНТЕЗА И ДЫХАНИЯ В КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ.....	14
1.2. ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ РАСТЕНИЙ К НИЗКИМ ТЕМПЕРАТУРАМ.....	21
1.2.1. Адаптация растений к низким температурам на уровне изменений липидной составляющей клеточных мембран, синтеза стрессовых белков и накопления криопротекторных соединений.....	23
1.2.2. Дыхание и фотосинтез при низких температурах	28
1.3. РОЛЬ МИТОХОНДРИЙ В МЕХАНИЗМАХ АДАПТАЦИИ РАСТЕНИЙ К НИЗКИМ ТЕМПЕРАТУРАМ.....	35
1.3.1. Разветвленная дыхательная цепь митохондрий растений как механизм повышения адаптивного потенциала клеток растений	40
1.3.2. Функционирование ротенон-нечувствительных НАД(Ф)-Н-дегидрогеназ и альтернативной оксидазы в митохондриях растений при действии низких температур.....	45
1.3.3. Роль митохондрий и альтернативных путей дыхания в фотосинтезе и защите хлоропластов от фотоингибирования	48
1.4. ВЫВОДЫ ИЗ ОБЗОРА ЛИТЕРАТУРЫ, ПОСТАНОВКА ЦЕЛИ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	51
2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	53
2.1. Объект исследования	53
2.2. Температурная обработка и обработка сахарозой.....	54
2.3. Определение степени ингибирования роста проростков и растений	55
2.4. Определение морозоустойчивости.....	55
2.5. Определение содержания водорастворимых углеводов	56
2.6. Выделение и очистка митохондрий	57
2.6.1. <i>Выделение митохондрий из этиолированных проростков.....</i>	<i>57</i>
2.6.2. <i>Выделение митохондрий из листьев зеленых и этиолированных растений</i>	<i>59</i>
2.6.3. <i>Определение интактности изолированных митохондрий</i>	<i>61</i>
2.6.4. <i>Определение степени загрязненности митохондрий хлоропластами</i>	<i>61</i>
2.7. Определение окислительной и фосфорилирующей активности митохондрий	61
2.7.1. <i>Определение окислительной и фосфорилирующей активности митохондрий из этиолированных проростков</i>	<i>62</i>

2.7.2. <i>Определение окислительной и фосфорилирующей активности митохондрий из этиолированных и зеленых листьев</i>	63
2.8. <i>Определение содержания активных форм кислорода в митохондриях</i>	64
2.9. <i>Выделение суммарного и митохондриального белка</i>	65
2.9.1. <i>Выделение суммарного белка</i>	65
2.9.2. <i>Выделение митохондриального белка</i>	66
2.10. <i>Электрофорез в ПААГе с ДДС-На</i>	66
2.11. <i>Вестерн-блоттинг</i>	67
2.12. <i>Список используемых реактивов</i>	68
2.13. <i>Статистическая обработка данных</i>	69
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	70
3.1. ВЛИЯНИЕ ХОЛОДОВОГО ЗАКАЛИВАНИЯ НА ПАРАМЕТРЫ МОРОЗОУСТОЙЧИВОСТИ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКОВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ	70
3.1.1. <i>Рост и морозоустойчивость проростков</i>	70
3.1.2. <i>Содержание сахаров в побегах</i>	73
3.1.3. <i>Синтез дегидринов в побегах</i>	73
3.2. ВЛИЯНИЕ ХОЛОДОВОГО ЗАКАЛИВАНИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ИЗ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКОВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ	75
3.2.1. <i>Окислительная и фосфорилирующая активность митохондрий</i>	75
3.2.2. <i>Функционирование альтернативных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ и альтернативной оксидазы</i>	79
3.2.3. <i>Антиоксидантная роль альтернативной оксидазы</i>	82
3.3. ПАРАМЕТРЫ МОРОЗОУСТОЙЧИВОСТИ ЭТИОЛИРОВАННЫХ И ЗЕЛЕННЫХ РАСТЕНИЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ХОЛОДОВОМ ЗАКАЛИВАНИИ И ОБРАБОТКЕ САХАРОЗОЙ	87
3.3.1. <i>Параметры морозоустойчивости этиолированных растений озимой пшеницы</i>	87
3.3.1.1. <i>Рост и морозоустойчивость растений</i>	87
3.3.1.2. <i>Содержание сахаров в листьях</i>	91
3.3.1.3. <i>Синтез дегидринов в листьях</i>	93
3.3.2. <i>Параметры морозоустойчивости зеленых растений озимой пшеницы</i>	94
3.3.2.1. <i>Рост и морозоустойчивость растений</i>	94
3.3.2.2. <i>Содержание сахаров в листьях</i>	99
3.3.2.3. <i>Синтез дегидринов в листьях</i>	100
3.4. ВЛИЯНИЕ ХОЛОДОВОГО ЗАКАЛИВАНИЯ И ЭКЗОГЕННОЙ САХАРОЗЫ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ИЗ ЛИСТЬЕВ ЭТИОЛИРОВАННЫХ И ЗЕЛЕННЫХ РАСТЕНИЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ	101
3.4.1. <i>Митохондрии из листьев этиолированных растений</i>	101

3.4.1.1. Окислительная и фосфорилирующая активность митохондрий	101
3.4.1.2. Функционирование альтернативных НАД(Ф)-Н-дегидрогеназ и альтернативной оксидазы	106
3.4.2. Митохондрии из листьев зеленых растений.....	109
3.4.2.1. Окислительная и фосфорилирующая активность митохондрий	109
3.4.2.2. Функционирование альтернативных НАД(Ф)-Н-дегидрогеназ и альтернативной оксидазы	116
4. ОБСУЖДЕНИЕ	120
4.1. ОБЩИЕ МЕХАНИЗМЫ И ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ МОРОЗОУСТОЙЧИВОСТИ ЭТИОЛИРОВАННЫХ И ЗЕЛЕННЫХ РАСТЕНИЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ	120
4.2. РОЛЬ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ФЕРМЕНТОВ ДЫХАНИЯ В МЕТАБОЛИЗМЕ ГЕТЕРОТРОФНЫХ И ФОТОАВТОТРОФНЫХ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ ПРИ ХОЛОДОВОМ ЗАКАЛИВАНИИ.....	126
4.3. ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ АЛЬТЕРНАТИВНОЙ ОКСИДАЗЫ И РОТЕНОН-НЕЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ НАД(Ф)-Н- ДЕГИДРОГЕНАЗ В ГЕТЕРОТРОФНЫХ И ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ ПРИ ХОЛОДОВОМ ЗАКАЛИВАНИИ	142
ВЫВОДЫ	151
ЛИТЕРАТУРА	153

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, связанный с функционированием АО

АТФ – аденозин-5-трифосфат

Ацетил-КоА – ацетил-коэнзим А

АФК – активные формы кислорода

БГК – бензгидроксамовая кислота

БСА – бычий сывороточный альбумин

ДДС-На – додецилсульфат натрия

ДИ – доверительный интервал

КДК – коэффициент дыхательного контроля

ДТТ – дитиотреитол

НАД⁺, НАД·Н – окисленная и восстановленная формы никотинамидадениндинуклеотида

НАДФ⁺, НАДФ·Н – окисленная и восстановленная формы никотинамидадениндинуклеотидфосфата

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

ПААГ – полиакриламидный гель

ПДК – пируватдегидрогеназный комплекс

ПФП – пентозофосфатный путь дыхания

РубФ – рибулозо-1,5-бисфосфат

Рубиско – рибулозо-1,5-бисфосфат-карбоксилаза/оксигеназа

СВ – среда выделения

СОД – супероксиддисмутаза

СП – среда промывания

СР – среда ресуспендирования

ССК – светособирающий комплекс

ТСБ – трис-солевой буфер

ТТСБ – ТСБ, содержащий Твин-20

ФГА – фосфоглицериновый альдегид
ФГК – фосфоглицериновая кислота
ФМСФ – фенилметилсульфонилфлюорид
Ф_н – неорганический фосфат
ФС I, ФС II – фотосистема I, фотосистема II
Хл-*a*, Хл-*b* – хлорофилл *a*, хлорофилл *b*
ЦО – цитохром *c* оксидаза или цитохромоксидаза
ЦП – цитохромный путь дыхания, связанный с функционированием ЦО
ЭДТА – этилендиаминтетраацетат
ЭТЦ – электрон-транспортная цепь
CBFs (C-repeat binding factors) – транскрипционные факторы
COR (COLD-Regulated) белки/гены – холодорегулируемые белки/гены
H₂DCF-DA – 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат
KCN – цианид калия
LEA-белки (Late Embryogenesis Abundant) – белки позднего эмбриогенеза
NDA – «внутренние» ротенон-нечувствительные НАД(Ф)-Н-дегидрогеназы
NDB – «внешние» ротенон-нечувствительные НАД(Ф)-Н-дегидрогеназы
PIMAC (Plant Inner membrane Mitochondrial Anion Channel) – анионный канал внутренней митохондриальной мембраны растений
RAB-белки (Responsive to ABA) – белки, синтез которых регулируется абсцизовой кислотой
SB (Sample Buffer) – буфер для образца
UCP (UnCoupling Protein) – разобщающий белок
VDAC (Voltage-Dependent Anion selective Channel) – селективный потенциал-зависимый анионный канал
V₃ (скорость окисления субстрата в состоянии 3) – скорость поглощения кислорода митохондриями при фосфорилировании АДФ
V₄ (скорость окисления субстрата в состоянии 4) – скорость поглощения кислорода митохондриями после истощения АДФ
•OH – гидроксил-радикал
H₂O₂ – пероксид водорода
O₂^{•-} – супероксид радикал-анион

ВВЕДЕНИЕ

Низкие температуры являются одним из ведущих факторов, вызывающих повреждение растений. Холодовой стресс влияет на рост и развитие растений и этим ограничивает урожайность важных сельскохозяйственных культур. Устойчивость растений к низкой неблагоприятной температуре повышается при длительном действии неповреждающей низкой температуры, такой процесс, в частности, происходит в осенний период у озимых злаков и получил название «холодовое закаливание» [44]. В процессе закаливания происходят различные изменения метаболизма, совокупность которых придает клеткам устойчивость к отрицательным температурам. Такие изменения включают синтез стрессовых белков, увеличение содержания фосфолипидов и повышение степени ненасыщенности их жирнокислотных остатков, накопление криопротекторов (в числе которых сахара), снижение интенсивности дыхания и фотосинтеза и др. [21, 40, 173, 210]. Фотосинтез и дыхание являются основными путями углеродного и энергетического метаболизма в растениях [11, 23, 35, 219]. В последние годы появляется все больше данных о тесном взаимодействии хлоропластов и митохондрий через внутриклеточные пулы интермедиатов [61]. Более того, дисфункция митохондрий влияет на функциональную активность хлоропластов [73]. Для процессов фотосинтеза, в результате которых происходит образование сахаров и высвобождение O_2 , необходимы световая энергия, CO_2 и H_2O . Затем синтезируемые в фотосинтезе сахара используются в дыхании для поддержания роста и для образования восстановительных эквивалентов и АТФ. В процессе дыхания высвобождается CO_2 , а O_2 восстанавливается до H_2O [219]. Роль сахаров, образуемых при фотосинтезе, в повышении морозоустойчивости растений не вызывает сомнения, что было показано ранее в работах отечественных ученых [41, 43, 44]. При холодовом закаливании озимых злаков изменяется активность митохондрий и скорость

окисления митохондриями субстратов дыхания [1, 26, 47]. Дыхательная цепь митохондрий растений, по сравнению с животными, более разветвленная и содержит устойчивую к ингибиторам комплексов III и IV терминальную альтернативную оксидазу (АО) и устойчивые к ингибитору комплекса I – ротенону НАД(Ф)·Н-дегидрогеназы (НАД(Ф)·Н-ДГ II типа) [100]. Данные ферменты не являются протонтранслоцирующими и 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 [95, 117, 228, 230]. Ингибирование АО приводило к сверхвосстановлению ЭТЦ хлоропластов [229]. Под действием света высокой интенсивности наблюдали увеличение экспрессии не только гена АО [116], но и генов, кодирующих «внутренние» и «внешние» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа [97, 100, 199]. Предполагается, что «внутренняя» НАД·Н-ДГ II типа играет важную роль в поддержании фотосинтетического метаболизма процессов фотодыхания [199], а функционирование «внешней» НАДФ·Н-дегидрогеназы, способной окислять цитозольный НАДФ·Н, экспортированный из хлоропластов, вероятно, способствует поддержанию окислительно-восстановительного баланса хлоропластов [100]. АО принимает участие в ответной реакции растений на низкую температуру [100, 219] и ее функция при этом, вероятно, связана с предотвращением развития окислительного стресса [71]. С использованием зеленых листьев пшеницы, но не изолированных из них митохондрий, обнаружена прямая корреляция между содержанием сахаров в среде инкубации и скоростью дыхания, и вкладом в дыхание цианид-резистентного альтернативного пути при 22 °С [68]. В то же время о связи функционирования АО, так же как и НАД(Ф)·Н-ДГ II типа с содержанием сахаров в клетках *in vivo* в условиях действия низких температур на растения данных нет. Так же отсутствуют сведения о сопряженности функционирования АО с НАД(Ф)·Н-ДГ II типа в

этих условиях, хотя сохранение способности митохондрий из гетеротрофных тканей растений окислять «внешний» НАД·Н при действии низких температур [103, 170, 232], как предполагается, является важным фактором в механизмах холодо- и морозоустойчивости. Таким образом, анализ научной литературы выявил, что функционирование АО и НАД(Ф)·Н-ДГ II типа в растительных митохондриях как гетеротрофных, так и фотоавтотрофных тканей при холодовом закаливании не достаточно изучено, не выяснено как изменение углеводного статуса при холодовом закаливании растений влияет на активность митохондрий и митохондриальных систем, несопряженных с синтезом АТФ.

В связи с этим, **целью** настоящей 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.

Основные 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 опосредуются 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 закалывание) 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. «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), 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 4 статьи в журналах из Перечня ВАК РФ.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из списка сокращения, 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.

Благодарности. Автор выражает глубокую сердечную благодарность научному руководителю д.б.н., доценту О.И. Грабельных за всестороннюю помощь, ценные советы и рекомендации, а также сотрудникам лаборатории физиологической генетики СИФИБР СО РАН д.б.н., доценту Т.П. Побежимовой за ценные советы и рекомендации и вед. технологу Н.А. Королевой за помощь в проведении экспериментальной работы. Автор благодарит заведующего лабораторией физиологической генетики СИФИБР СО РАН д.б.н., профессора В.К. Войникова и весь коллектив лаборатории за теплое отношение и моральную поддержку.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПРОЦЕССАХ ФОТОСИНТЕЗА И ДЫХАНИЯ В КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ

Фотосинтез и дыхание являются основными путями углеродного и энергетического метаболизма в растениях [23, 35, 219]. Для процессов фотосинтеза, в результате которых происходит образование сахаров и высвобождение O_2 , необходимы световая энергия, CO_2 и H_2O . Образующиеся в процессе фотосинтеза сахара используются в процессе дыхания для поддержания роста и для образования восстановительных эквивалентов и АТФ. В процессе дыхания высвобождается CO_2 , а O_2 восстанавливается до H_2O [11, 23, 35].

Благодаря фотосинтетическим реакциям растения поглощают энергию солнечного света и используют ее для синтеза органических соединений из неорганических молекул (CO_2) и ионов (нитрат, сульфат) [46]. Фотосинтез представлен двумя этапами – световым и темновым. Световой этап светозависим и включает в себя: 1) поглощение энергии солнца пигментами (антенных) светособирающих комплексов (ССК), 2) преобразование энергии фотонов реакционными центрами фотосистемы I (ФС I) и фотосистемы II (ФС II) и 3) транспорт электронов по ЭТЦ хлоропластов [46].

Фотосинтетические пигменты мембран тилакоидов (их большая часть) находятся в форме пигмент-белковых комплексов, которые включают ССК, сопряженный с реакционным центром ФС [23]. В состав ССК входят полипептиды, с которыми связаны хлорофиллы *a* (Хл-*a*), хлорофиллы *b* (Хл-*b*), ксантофиллы и каротины [46]. Первичным донором электронов реакционного центра ФС II является димер Хл-*a* с максимумом поглощения 680 нм, и его антенна содержит четыре основных ССК (ССК-II *a-d*), при этом ССК-II-*b* является основным компонентом, т.к. на нем расположено 67% всего хлорофилла антенны ФС II [23, 46]. У реакционного центра ФС I первичным донором электронов является димер Хл-*a* с максимумом

поглощения 700 нм [23, 46]. ФС I содержит меньше ССК, чем ФС II, но ее ССК сходны с таковыми ФС II [46]. От активности протеинкиназ и окислительно-восстановительного состояния компонентов фотосинтетической ЭТЦ зависит перераспределение энергии света между ФС через возможность ССК II связываться с ФС I [23].

Конечными продуктами светового этапа фотосинтеза являются НАДФ·Н и АТФ, которые расходуются в реакциях темновой стадии для синтеза углеводов [46]. В отличие от светового этапа для протекания темновых реакций свет не нужен, в этих реакциях происходит ассимиляция CO_2 в цикле Кальвина с образованием триозофосфата – 3-фосфоглицеринового альдегида (ФГА). Цикл Кальвина условно делят на четыре стадии: 1) карбоксилирование, 2) восстановление фосфоглицериновой кислоты (ФГК), 3) регенерация рибулозо-1,5-бисфосфата (РуБФ) и 4) синтез углеводных продуктов фотосинтеза. Стадия карбоксилирования характеризуется реакциями присоединения CO_2 к диенольной форме РуБФ с образованием ФГК. Рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа (Рубиско) – фермент непосредственно катализирующий реакцию фиксации CO_2 [46]. На второй стадии цикла Кальвина происходит восстановление ФГК до ФГА с использованием АТФ и НАДФ·Н, образованных в световых реакциях фотосинтеза. На третьей стадии цикла Кальвина ФГА преобразуется в РуБФ. Регенерация РуБФ необходима для того, что РуБФ вновь мог участвовать в фиксации CO_2 . Из шести молекул ФГА пять молекул используются в регенерации РуБФ, а одна покидает цикл и используется в четвертой стадии цикла Кальвина для синтеза углеводов. Из ФГА и фосфодиоксиацетона под действием альдолазы происходит синтез фруктозо-1,6-дифосфата. Затем из фруктозо-1,6-дифосфата могут образовываться сахароза или крахмал [23].

Углекислый газ и кислород способны конкурировать друг с другом в каталитическом центре Рубиско, поэтому этот фермент может катализировать два процесса с РуБФ: карбоксилировать – фиксация CO_2

(цикл Кальвина) и окисленировать – побочная реакция – фиксация O_2 (фотодыхание) [46].

В реакциях фотодыхания происходит окисление РубФ до ФГК и фосфогликолевой кислоты. Затем из фосфогликолевой кислоты образуются аминокислоты, а в ходе реакций этих превращений выделяется CO_2 . Таким образом, в процессе фотодыхания происходит поглощение O_2 и выделение CO_2 . Фотодыхание осуществляется с участием трех органелл клетки – хлоропластов, пероксисом и митохондрий [23, 46, 183]. Образованный в хлоропластах гликолат поступает в пероксисомы, где метаболизируется до глицина, который поступает в митохондрии. С помощью реакций глициндекарбоксилазного комплекса, расположенного в митохондриях, происходит образование серина и выделение CO_2 . Затем серин может поступать в пероксисомы, где претерпевает ряд изменений до образования ФГК, или оставаться в митохондриях [23, 46, 183].

В клетках растений глюкоза претерпевает ряд основных превращений: 1) запасается в виде сахарозы или полисахаридов; 2) за счет гликолиза окисляется до пирувата с образованием АТФ и различных интермедиатов; 3) в реакциях пентозофосфатного пути дыхания окисляется до рибозо-5-фосфата, который необходим для синтеза нуклеиновых кислот и НАДФ·Н [27, 35].

Гликолитические превращения углеводов (гликолиз), цикл Кребса и цитохромоксидазная цепь транспорта электронов – основной путь дыхания листьев [35]. Гликолиз – процесс анаэробного распада глюкозы до образования пирувата, идущий с высвобождением энергии, часть которой запасается в виде АТФ и НАДФ·Н [27].

Гликолиз протекает в три этапа: 1) подготовительный этап (образование фруктозо-1,6-бисфосфата, который расщепляется на ФГА и фосфодиоксиацетон); 2) первое субстратное фосфорилирование (из ФГА образуются НАДФ·Н, АТФ и ФГК); 3) второе субстратное фосфорилирование (синтез АТФ при переносе остатка фосфорной кислоты с фосфоенолпирувата

на АДФ и образование пирувата) [23]. Затем образованный в гликолитических реакциях пируват из цитоплазмы поступает в митохондрии, где окисляется до CO_2 и H_2O [35]. Однако конечным продуктом гликолитических реакций может быть не только пируват, но и малат, который образуется из оксалоацетата. Малат либо окисляется с помощью малатдегидрогеназы до оксалоацетата, либо с помощью малик-энзима декарбоксилируется до пирувата, затем оксалоацетат или пируват поступают в цикл Кребса [23]. Окисление пирувата до ацетил-коэнзима А (ацетил-КоА) и образование НАД·Н происходит в матриксе митохондрий с участием пируватдегидрогеназного комплекса (ПДК). Затем ацетил-КоА вступает в реакции цикла Кребса, взаимодействуя с оксалоацетатом. В ходе реакций цикла Кребса происходит образование НАД·Н, НАДФ·Н, ФАД·Н₂, которые окисляются ферментами дыхательной цепи митохондрий [35].

Компоненты основной дыхательной цепи представлены 5 комплексами: НАД·Н: убихинон-оксидоредуктаза (комплекс I), сукцинат: убихинон-оксидоредуктаза (комплекс II), убихинол: цитохром *c*-оксидоредуктаза (комплекс III), цитохром *c* оксидаза (комплекс IV) и АТФ-синтаза (комплекс V) (рис. 1) [100]. Транспорт электронов через комплексы I, III и IV сопряжен с переносом протонов из митохондриального матрикса в межмембранное пространство митохондрий, что приводит к генерации трансмембранного потенциала протонов и синтезу АТФ через АТФ-синтазу [219].

Цитохром *c* оксидаза или цитохромоксидаза (ЦО) – терминальная оксидаза цитохромного пути, катализирующая восстановление O_2 до H_2O [219]. В добавок к основному цитохромному пути транспорта электронов (ЦП), сопряженному с фосфорилированием АДФ, растительные митохондрии имеют альтернативный путь транспорта электронов (АП), связанный с функционированием цианид-резистентной АО и НАД(Ф)·Н-ДГ II типа [56, 100]. Функционирование НАД(Ф)·Н-ДГ II типа позволяет обходить протон-транслоцирующий комплекс I или окислять

цитоплазматический НАД(Ф)·Н, а функционирование АО – обходить протон-транслоцирующие комплексы III и IV [134].

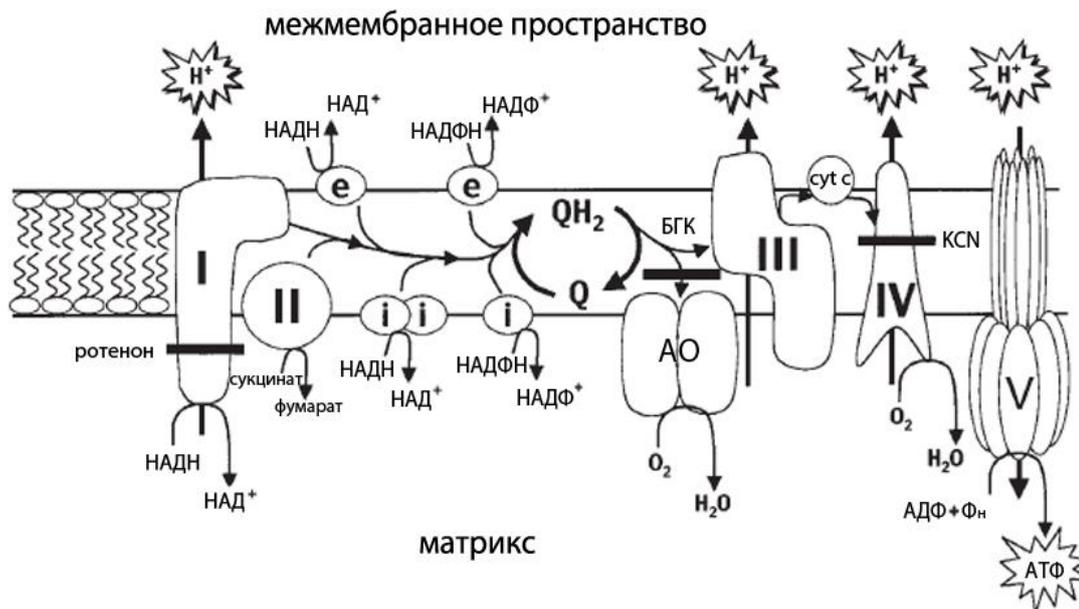


Рис. 1. Дыхательная цепь, локализованная во внутренней митохондриальной мембране растительных клеток [100].

Обозначения: e – ротенон-нечувствительные «внешние» НАД(Ф)·Н-дегидрогеназы; i – ротенон-нечувствительные «внутренние» НАД(Ф)·Н-дегидрогеназы; АО – альтернативная оксидаза; QH₂ – убихинол; Q – убихинон; cyt c – цитохром c оксидаза; I, II, III, IV, V – комплексы дыхательной цепи митохондрий.

Перенос электронов посредством НАД(Ф)·Н-ДГ II типа и АО не сопряжен с переносом протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану [100].

В клетках растений помимо гликолиза и цикла Кребса функционирует еще один важный путь окисления гексоз – окислительный пентозофосфатный путь (ПФП), доля которого не превышает 30% общего дыхания [35]. ПФП протекает в цитоплазме, пропластидах и хлоропластах в два этапа: окислительный этап – окисление глюкозо-6-фосфата (образование рибулозо-5-фосфата, НАДФ·Н и выделение CO₂) и неокислительный этап – образование глюкозо-6-фосфата из рибулозо-5-фосфата. Хотя энергетический выход ПФП высокий, его физиологическая роль заключается в поддержании пластического, а не энергетического обмена [23].

В последнее время в научной литературе появляется все больше данных, свидетельствующих о тесном взаимодействии хлоропластов и митохондрий через внутриклеточные пулы интермедиатов (рис. 2) [61]. Образованные в фотосинтетических реакциях триозофосфаты либо транспортируются в цитозоль, где поступают в гликолиз с образованием субстратов для цикла Кребса, либо используются для синтеза сахарозы [61].

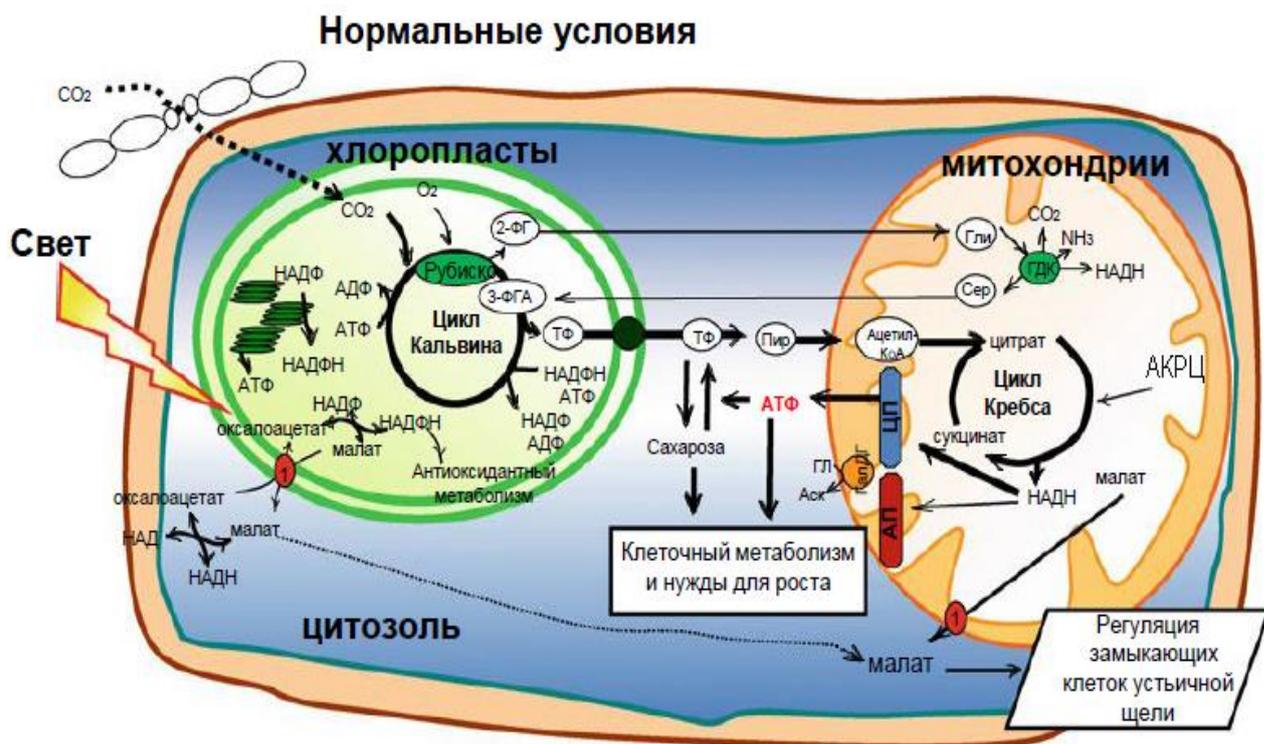


Рис. 2. Взаимодействие хлоропластов и митохондрий в растительной клетке через внутриклеточные пулы интермедиатов [61].

Обозначения: 1 – декарбоксилатный транспортер; 2-ФГ – 2-фосфогликолат; 3-ФГА – 3-фосфоглицерат; АКРЦ – аминокислоты с разветвленными цепями; АП – альтернативный путь дыхания; Аск – аскорбат; ГалДГ – L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа; ГДК – глициндекарбоксилазный комплекс; ГЛ – L-галактоно-1,4-лактон; Гли – глицин; Пир – пируват; Сер – серин; ТФ – триозофосфат; ЦП – цитохромный путь дыхания.

Триозофосфаты также могут образовываться в ПФП хлоропластов и поступать в реакции гликолиза и цикла Кребса [23]. Около 70-95% всех гексофосфатов гидролизуются через ПДК и альдолазу гликолиза, в то время как остатки окисляются в триозофосфат через ПФП [161]. При временной инактивации фотосинтетической активности происходит усиление дыхательного метаболизма в клетках листа, что компенсирует

дефицит CO_2 , НАДФ·Н, АТФ и продуктов обмена [35]. Усиление дыхательного метаболизма приводит к стабилизации первичных фотохимических реакций, локализованных в хлоропластах, а также стимулирует карбоксилирующую активность Рубиско [35]. Соединения, образованные в ПФП, могут включаться в реакции цикла Кальвина и участвовать в фиксации CO_2 [23]. ПФП функционирует в темноте, что способствует поддержанию в хлоропластах необходимого уровня НАДФ·Н в отсутствии света [23].

Скорость дыхания сильно зависит от интенсивности фотосинтеза (цикла Кальвина) и фотодыхания [183]. При избыточном освещении в хлоропластах образуется много НАД(Ф)·Н, которые могут влиять на дыхательную активность митохондрий и функционирование в них ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-ДГ и АО [228]. От активности ферментов цикла Кребса зависят реакции фотосинтеза: от функционирования малатдегидрогеназы, фумаразы и сукцинатдегидрогеназы зависят процессы ассимиляции CO_2 , функционирование изоцитратдегидрогеназы влияет на уровень НАД(Ф)·Н и содержание фотосинтетических пигментов в хлоропластах, а цитратсинтаза может ингибировать ассимиляцию нитратов [61]. Обнаружена важная роль АО, разобщающего белка UCP (англ. “UnCoupling Protein”), а также комплекса I дыхательной цепи митохондрий в поддержании фотосинтетических реакций [61, 117, 151]. Комплекс I дыхательной цепи митохондрий необходим для поддержания оптимальной эффективности фотосинтеза, особенно когда активны процессы фотодыхания [61]. Малат влияет на скорость фотосинтетических реакций через ассимиляцию CO_2 , т.к. выполняет важную роль в метаболизме замыкающих клеток устьиц [46]. Предполагается, что увеличенная активность L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы митохондрий приводит к активации реакций фотосинтеза [61].

Таким образом, процессы фотосинтеза и дыхания в растительной клетке взаимосвязаны и изменения одного из них неизбежно приводит к

изменениям другого. Особенно важно изучение механизмов взаимодействия данных процессов при изменении условий окружающей среды, в частности, при изменении температурных оптимумов среды произрастания.

1.2. ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ РАСТЕНИЙ К НИЗКИМ ТЕМПЕРАТУРАМ

Снижение температуры среды обитания растений влияет на рост и развитие растений и этим ограничивает урожайность важных сельскохозяйственных культур. Низкие неблагоприятные температуры могут приводить к повреждению растений и их гибели. Степень повреждения зависит от температуры и продолжительности воздействия, от вида растения и предыдущих условий произрастания [21]. Устойчивость травянистых растений к действию повреждающих отрицательных температур повышается при длительном действии неповреждающей низкой положительной и отрицательной температур, такой процесс получил название «холодовое закаливание» [17, 44].

Под действием низкой положительной температуры в метаболизме растений происходят различные изменения, совокупность которых придает клеткам устойчивость к образованию льда и обезвоживанию. Низкая температура влияет на поглощение воды и питательных веществ, текучесть мембран, конформацию белков и нуклеиновых кислот, резко влияет на клеточный метаболизм непосредственно через снижение скорости биохимических реакций или косвенно через масштабное перепрограммирование экспрессии генов (рис. 3) [81, 87, 173, 210].

Наиболее существенным изменением метаболизма при холодовом закаливании является синтез специфических стрессовых белков, повышение содержания фосфолипидов мембран и степени ненасыщенности их жирнокислотных остатков, накопление криопротекторных веществ [40, 190, 210, 224]. Под действием низкой температуры также происходят изменения в гормональном статусе растений [87, 96], в содержании антиоксидантов и

активности антиоксидантных ферментов [120].



Рис. 3. Изменения в метаболизме растительных клеток в процессе холододового закаливания.

У различных растительных видов устойчивость к низкой температуре проявляется по-разному и зависит от перепрограммируемой экспрессии генов, которая изменяет их физиологию, метаболизм и рост [81]. В условиях низкой температуры происходит индукция экспрессии генов холодорегулируемых белков (COR-генов, англ. “Cold Regulated”) [173]. Некоторые растворимые сахара, активные формы кислорода (АФК) и фотосинтетические метаболиты выступают как сигнальные молекулы, которые могут регулировать экспрессию COR-генов [110]. Индукция экспрессии COR-генов может происходить через транскрипционные каскады путей, зависимых и независимых от абсцизовой кислоты (АБК) [39, 110]. При низкой температуре АФК могут активировать митогенактивированный протеинкиназный каскад (МАР-киназный каскад) (AtМЕКК1-AtМКК2-AtМРК4/6), который регулирует устойчивость растений к низким

отрицательным температурам и другим стрессовым факторам [80]. АФК могут выступать в качестве сигнальных молекул и перепрограммировать экспрессию генов, вероятно, путем изменения концентрации ионов кальция и активации соответствующих транскрипционных факторов [81]. Цитозольный Ca^{2+} влияет на экспрессию генов транскрипционных факторов CBFs (англ. “C-repeat binding factors”) и COR-генов при холодовом закаливании [81]. Транскрипционные факторы CBFs, DREB1 (англ. “Dehydration-responsive element binding factor”) и ICE1 (англ. “Inducer of CBF Expression 1”) участвуют в регуляции АБК-независимой экспрессии COR-генов [110, 135]. Холодовой стресс индуцирует MAP-киназный каскад, но молекулярная связь между киназами и транскрипционными факторами остается до сих пор неизвестной. ICE1-CBF3/DREB1A транскрипционный каскад – важный каскад в регуляции передачи сигналов и холодовой адаптации [135].

Изменения, происходящие в период холодового закаливания, направлены на поддержание структурной целостности и функционального состояния растительных клеток к последующему действию низких повреждающих температур.

1.2.1. Адаптация растений к низким температурам на уровне изменений липидной составляющей клеточных мембран, синтеза стрессовых белков и накопления криопротекторных соединений

Клеточные мембраны являются мишенями первичного воздействия стрессового фактора и первой линией защиты от него [49]. Благодаря многообразию функций клеточных мембран (барьерная, осмотическая, транспортная, структурная, биосинтетическая, энергетическая, рецепторно-регуляторная, секреторная и т.д.), изменения в мембранах могут влиять на протекание большинства клеточных процессов за счет изменений в мембранном транспорте, связывании или высвобождении ферментов и регуляторных белков, и активности мембранных ферментов [49, 81, 172, 224]. Связанные с температурой модификации физического состояния мембран и

белков приводят к изменению метаболических реакций и концентрации метаболитов [81].

Плазматическая мембрана может быть первичным сенсором низкотемпературного воздействия за счет изменения ее текучести [49, 135, 172]. Структурные модификации в мембранах в большей степени затрагивают липиды (прежде всего жирные кислоты) [49]. Липидные медиаторы, такие как фосфатидная кислота, лизофосфолипиды и свободные жирные кислоты вовлечены в передачу сигналов в растительной клетке в ответ на стресс [224]. Ca^{2+} является стабилизатором клеточных мембран – влияет на проницаемость мембран для других ионов и регулирует транспорт воды, а также его стабилизирующее действие может происходить и косвенно через содержание полиаминов, необходимых для восстановления мембранной проницаемости [49]. В условиях низких температур FRY1/HOS2 инозитолполифосфат-1-фосфатаза регулирует уровень цитозольного инозитол-1,4,5-трифосфата, который, в свою очередь, контролирует уровень цитозольного Ca^{2+} [80]. Действие низкой температуры приводит к временному увеличению концентрации Ca^{2+} в цитозоле, что приводит к активации COR-генов [135]. В результате сильного воздействия неблагоприятной низкой температуры количество ионов кальция в цитоплазме значительно увеличивается, и мембранные структуры нарушаются, так же как и функционирование мембраносвязанных ферментов. Так, H^+ -АТФ-аза инактивируется, а фосфолипазы, наоборот, активируются, что стимулирует деградацию мембранных липидов [40] и высвобождение свободных жирных кислот, которые могут стать субстратом для окисления [20].

Повышение устойчивости плазматической мембраны к действию низкой неблагоприятной температуры обусловлено изменениями в соотношении различных групп жирных кислот липидов и степени их насыщенности/ненасыщенности [49]. Для того чтобы при снижении температуры мембрана не затвердевала, она должна содержать достаточное

количество липидов с ненасыщенными жирнокислотными остатками [48], что делает ее более текучей при пониженных температурах и увеличивает ее проницаемость для воды [21]. Полиненасыщенные жирные кислоты могут способствовать поддержанию жидкой консистенции липидов, смещая точку перехода в твердое состояние в более низкотемпературную область [48]. Во время холодовой адаптации повышается общее содержание мембранных липидов, особенно фосфатидилхолинов, которые участвуют в образовании ламеллярной структуры мембран, и наблюдается увеличение степени ненасыщенности жирных кислот мембранных липидов [40, 224]. Липиды, содержащие α -линоленовую кислоту, играют решающую роль в развитии морозостойкости растений, поскольку увеличение содержания α -линоленовой кислоты повышает текучесть липидного бислоя и предотвращает фазовое разделение липидов под действием низких температур [5, 220]. Устойчивость растительных клеток к холоду может увеличиваться и за счет снижения содержания в плазматической мембране сфинголипидов [148]. Сфинголипиды, так же как и стеролы регулируют активность мембранного транспорта, поэтому изменения в липидных микродоменах могут определять активность белков при холодовой адаптации [148]. Поскольку плазматическая мембрана играет значительную роль в восприятии сигнала и клеточном гомеостазе, то сохранение активности белков плазматической мембраны – важный фактор, определяющий устойчивость растений к стрессу [49, 172].

При холодом закаливании происходит синтез COR-белков [110], среди которых выделяются дегидрины – высоко гидрофильные белки из семейства белков позднего эмбриогенеза (LEA-белков, англ. “Late Embryogenesis Abundant”) [171, 173, 187]. Отличительной особенностью всех дегидринов является наличие консервативного лизин-обогащенного домена EKKGIMDKIKEKLPG вблизи С-конца, известного как К-сегмент [83]. Гены дегидринов экспрессируются на стадии позднего эмбриогенеза или в вегетативных тканях растений под действием различных стрессовых

факторов (низкие и высокие температуры, водный дефицит, засоление и т.д.), которые приводят к обезвоживанию клеток [124, 171, 173, 187]. Экспрессия многих дегидринов зависит от содержания АБК (основного гормона, накапливающегося в период наибольшего повышения морозостойкости растений), поэтому дегидрины также называют RAB-белками (англ. “Responsive to ABA”) [124, 171]. В условиях действия низких температур дегидрины защищают макромолекулы клеточных структур от деградации, выполняют криопротекторную функцию, проявляют антифризную и антиоксидантную активности [124, 187, 190]. Дегидрины имеют мол. массу от 9 до 200 кД и локализуются в различных компартментах клетки – вблизи плазмалеммы, в цитоплазме, ядре, вакуоли, митохондриях [32, 171, 187]. В растениях озимой пшеницы важную роль при холодовом стрессе играет дегидрин WCS120 из семейства WCS (англ. “Wheat Cold-Specific”) [87].

При закаливании растений к холоду важную роль играют также антифризные белки, которые либо тормозят образование кристаллов льда или ограничивают их рост, либо защищают мембраны и белки от последствий обезвоживания [173]. В растениях озимой пшеницы обнаружен белок *TaIRI-1* (англ. “*Triticum aestivum* Ice Recrystallization Inhibition”), который ингибирует рост ледяных кристаллов. Жасмоновая кислота и этилен вовлечены в регуляцию генов этого белка при холодовом закаливании холодоустойчивых растений [214].

При холодовом закаливании в растениях повышается и содержание белков водных каналов – аквапоринов, функционирование которых приводит к усилению выхода воды из клеток при внеклеточном льдообразовании, что способствует предотвращению нуклеации льда внутри клеток [40]. В растениях пшеницы обнаружены белки WCSP1 (англ. “Wheat Cold Shock domain Protein 1”), которые выполняют те же биохимические функции, что и бактериальные белки с доменом холодового шока CSD (англ. “Cold Shock Domain”) [177]. Эти белки локализованы в митохондриях, ядре и цитозоле и могут связываться с нуклеиновыми кислотами, понижая температуру

плавления их двойных спиралей, что в условиях низких температур может способствовать поддержанию необходимого уровня структурной подвижности нуклеиновых кислот [36]. Накопление WCSPs при холодовом закаливании происходило в меристематических тканях побегов озимого сорта пшеницы, но не ярового, что предполагает возможную роль этих белков в холодной адаптации растений [177].

В развитии морозоустойчивости растений непосредственное участие принимают водорастворимые углеводы [92, 173]. Накопление больших количеств сахаров является одним из путей сохранения воды в клетках растений в незамерзшем состоянии при низкой температуре [40, 210]. Повышенная морозоустойчивость растений связана с увеличением содержания простых сахаров, таких как трегалоза, рафиноза, фруктоза и сахароза [92, 173]. Изменения в содержании водорастворимых углеводов при низкой температуре могут влиять на экспрессию генов [138]. Показано, что накопление сахарозы и рафинозы сопровождается экспрессией генов, участвующих в синтезе, метаболизме и транспорте сахаров (β -амилаза и сахаросинтаза) [92]. В растениях арабидопсиса холодовое воздействие ($5\text{ }^{\circ}\text{C}$) приводило к индукции генов β -амилазы, что коррелировало с накоплением мальтозы [121]. Мальтоза в условиях низкотемпературного стресса способна защищать белки, мембраны и фотосинтетическую ЭТЦ [121]. К увеличению морозоустойчивости озимой пшеницы приводит накопление олигосахарина, который увеличивает восприимчивость клеток к АБК-сигнальным путям [162]. Кроме того, сахара являются основными субстратами клеточного дыхания, субстратами для синтеза стрессовых белков и липидов и репарации этих макромолекул после низкотемпературного стресса, выступают в качестве низкомолекулярных антиоксидантов и посредников в передаче низкотемпературного сигнала [11, 40, 110].

В ответ на низкую температуру растения накапливают и другие защитные соединения, такие как свободные стерины, ацетилированные стерины, стериновые гликозиды, глюкозиды, глутаминовую кислоту,

аминокислоты (аланин, глицин, пролин, и серин), полиамины и бетаины [96]. Эти различные соединения выполняют осморегуляторную и осмопротекторную функции [210].

1.2.2. Дыхание и фотосинтез при низких температурах

Процессы дыхания и фотосинтеза зависят от многих стрессовых факторов, в том числе и от низкой температуры. Изменение температуры приводит к быстрому изменению интенсивности дыхания, т.к. дыхание является температуро-зависимым процессом [94]. Наличие субстратов дыхания, потребность в продуктах дыхания (аденилаты, в частности отношение [АТФ]/[АДФ]) и активность ферментов дыхания контролируют дыхательный поток. При изменении температуры окружающей среды изменяется и контроль дыхательного потока [66]. В целом понижение температуры приводит к изменению морфологии митохондрий, доступности субстратов дыхания, экспрессии генов, содержания белков и активности дыхательных ферментов, а также к перераспределению вклада в дыхание альтернативного и цитохромного путей.

Действие низкой температуры обычно приводит к увеличению содержания растворимых сахаров в листьях и, таким образом, к доступности субстратов для дыхания [138]. Активность ключевых ферментов, которые контролируют поступление субстратов в митохондрии, таких как ферменты ПДК и малик-энзим, может снижаться при низких температурах [129]. Показано, что интенсивность дыхания листьев зависит от длительности периода охлаждения [11, 18, 94]. Низкая температура в первые часы воздействия приводила к снижению скорости дыхания, затем к ее восстановлению и последующей стимуляции при длительном воздействии [18, 111].

В ответ на низкую температуру возрастает экспрессия генов и активность ряда ферментов, вовлеченных в гликолиз. Так, увеличивается скорость реакций гидролиза сахарозы в цитозоле и скорость превращений

фруктозо-6-фосфата в фруктозо-1,6-бисфосфат и фосфоенолпирувата в пируват [67], увеличивается экспрессия генов, кодирующих енолазу и пируват-2,3-бисфосфоглицерат-зависимую фосфоглицератмутазу [84], увеличивается активность АТФ-зависимой фосфофруктокиназы и пиродифосфат-зависимой фосфофруктокиназы [102]. Было установлено, что активность АТФ-зависимой фосфофруктокиназы и пиродифосфат-зависимой фосфофруктокиназы выше у холодоустойчивых сортов томата [102]. В то же время низкая температура приводит к снижению экспрессии генов, кодирующих ферменты, вовлеченные в реакции цикла Кребса, в частности аконитатгидратазы [84].

Низкая температура влияет на содержание АТФ и АДФ в клетках растений. Показано, что в листьях томата концентрация АТФ и АДФ при охлаждении значительно снижается, в то же время в листьях закаленного холодоустойчивого сорта томата снижение содержания АТФ и отношения АТФ/АДФ в начальный момент закаливания менее выражено и увеличивается к концу холододового закаливания [102]. Синтез АТФ в клетках растений происходит с участием ферментов дыхательной цепи и АТФ-синтазы, локализованных во внутренней мембране митохондрий. Существует достаточно много сведений об ответной реакции митохондрий на низкую температуру [1, 26, 47, 57, 79, 102, 141, 175, 194, 223]. О.К. Аткин с соавт. предложили два механизма адаптации дыхания к низкой температуре (рис. 4) [66]. Первый механизм характеризуется отсутствием изменений в интенсивности дыхания, однако в этих условиях наблюдается перераспределение путей дыхания за счет изменений в активности таких ферментов как АО и в содержании определенных ферментов. При втором механизме адаптации происходят изменения в интенсивности общего дыхания за счет увеличения концентрации митохондриальных белков и содержания определенных ферментов. Эти два механизма адаптации дыхания могут переключаться на уровне регуляции активности ферментов в

зависимости от доступности субстратов дыхания и/или ограничения аденилатами [66].

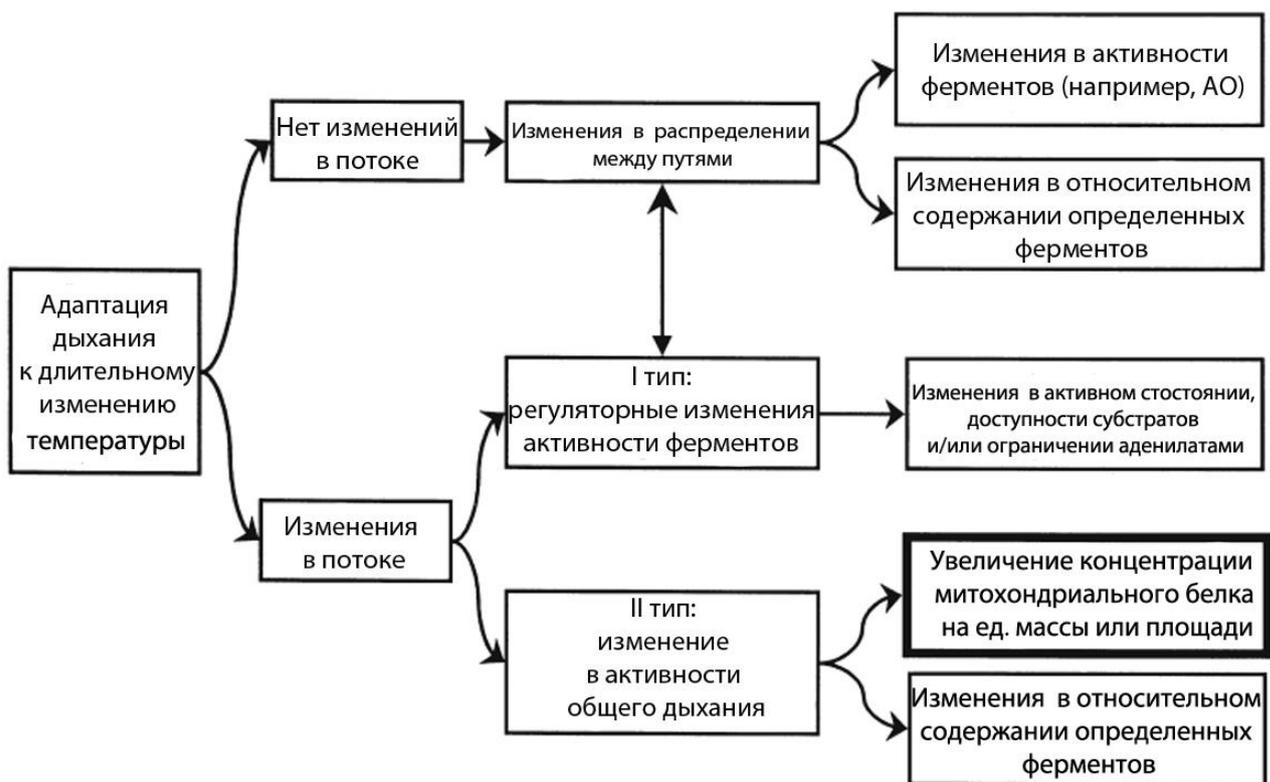


Рис. 4. Механизмы адаптации дыхания растений к изменению температуры [66].

При действии на растения озимой пшеницы низких закаливающих температур наблюдали выраженную морфологическую гетерогенность митохондрий узлов кущения, наряду с округлыми органеллами появлялись органеллы с тороидальной, чашевидной, гантелевидной формами [1]. Такие митохондрии, по сравнению с округлыми, имеют бóльшую относительную поверхность соприкосновения с цитоплазмой, что обеспечивает высокий уровень энергообмена между ними [1]. На начальном этапе холодого закаливания в листьях озимой пшеницы происходила пролиферация митохондрий [18]. Морфологическую гетерогенность и увеличение количества митохондрий в растительной клетке можно отнести к адаптивным реакциям при понижении температуры окружающей среды.

При холодовом закаливании арабидопсиса наблюдали снижение объема матрикса в митохондриях клеток мезофилла, что свидетельствует о

снижении активности процессов, расположенных в матриксе, таких как цикл Кребса и/или фотодыхание, по сравнению с активностью транспорта электронов по дыхательной цепи митохондрий [111]. Показано, что под действием низкой температуры снижается скорость поглощения O_2 митохондриями [26, 47], при этом тормозится транспорт электронов через ЦП [168], вследствие чего может происходить образование АФК. Дыхательная цепь митохондрий растений, в отличие от животных, имеет альтернативный путь транспорта электронов с альтернативной оксидазой в качестве терминальной оксидазы [100]. На митохондриях сои было показано, что АП менее чувствителен к изменениям температуры, чем ЦП [65]. На фоне снижения ЦП происходит активация АП [79, 94, 101, 127, 141, 152, 168, 175, 184]. Активация АП при холодовом закаливании может снижать образование АФК в клетках растений, что было выявлено в экспериментах с использованием растений арабидопсиса, экспрессирующих ген АО пшеницы – *WAOX1a* [168]. Перераспределение потока электронов через АП и ЦП, а также степень аденилатного контроля могут играть важную роль в определении общей чувствительности дыхания растений к температуре [61].

Таким образом, адаптация дыхания к низкой температуре зависит от всех составляющих процесса клеточного дыхания, начиная с гликолиза в цитозоле и заканчивая окислительным фосфорилированием во внутренней мембране митохондрий.

Фотосинтез, как и дыхание – температурно-зависимый процесс, но в отличие от дыхания фотосинтез менее чувствителен к снижению температуры [19]. Изменение оптимальной температуры окружающей среды влияет на скорость реакций фотосинтеза путем изменения межклеточного содержания CO_2 , скоростей карбоксилирования и регенерации РуБФ, отношения скорости регенерации РуБФ к скорости его карбоксилирования [203], а также содержанием неорганического фосфата (Φ_n) [189]. Максимальная скорость регенерации РуБФ часто определяет температурную зависимость фотосинтеза к повышенному содержанию CO_2 [203]. Диффузия

CO₂ в листья и хлоропласты в изменяющихся температурных условиях зависит от эффекта температуропроводимости, устьичного контроля и проницаемости мембран [189]. Холодоустойчивые виды растений, в отличие от чувствительных, способны дифференцированно адаптироваться к низким температурам и проявлять увеличенную светозависимую скорость поглощения CO₂ при закаливании [207]. Одними из первых на действие низкой температуры реагируют мембраны хлоропластов, причем изменяется не только их биохимический состав, но и вся структура тилакоидной системы претерпевает целый ряд серьезных изменений [38, 45]. Под действием низкой температуры снижается общее число и доля крупных гран, увеличиваются размеры клеток мезофилла, число и размеры хлоропластов, увеличивается площадь стромы, снижается интенсивность фотосинтеза [19, 38, 84, 145]. В первые часы действия низкой температуры снижается общее содержание хлорофиллов и содержание хлорофиллов в ССК и увеличивается нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла [45]. При холодовом стрессе, вызванном действием низкой температуры 6 °С, в листьях риса наблюдали деградацию большой субъединицы Рубиско и белков, входящих в состав белкового комплекса ФС II, а также седогептулозо-1,7-бисфосфата и α и β -субъединиц АТФ-синтазы [84].

Низкая температура влияет на первичные реакции фотосинтеза, катализируемые ФС I и ФС II, и на транспорт электронов по фотосинтетической ЭТЦ. Наиболее сильный эффект низкотемпературное воздействие оказывает именно на электронный транспорт [138]. Этому способствует увеличение вязкости тилакоидной мембраны хлоропластов, что приводит к снижению скоростей ферментативных реакций. Снижение ферментативной активности при низких температурах совместно с чрезмерной световой энергией приводит к фотоингибированию ФС II [191]. У многих растений низкая температура вызывает уменьшение квантового выхода флуоресценции хлорофилла, что свидетельствует о развитии медленно затухающих процессов и повреждении реакционных центров ФС II

[12]. Слабое снижение квантового выхода флуоресценции *Xл-а* у озимого сорта пшеницы, по сравнению с яровым, указывает на более эффективную защиту ФС II от фотоокислительного повреждения [12]. На растениях арабидопсиса показано снижение активности ФС I и ее фотоингибирование при обработке светом и низкой температурой, в этих условиях наблюдали увеличение основных фосфорилированных белков ФС II (P-CP43, P-D2, P-D1), что указывает на повышенное восстановленное состояние пластохинонового пула между ФС II и ФС I [132]. Было предположено, что инактивация ФС II, диссипация энергии возбуждения в реакционных центрах ФС II и диссипация энергии в антенных комплексах с участием зеаксантина являются основными фотозащитными механизмами при сезонном снижении температуры [37]. При этом на ранних этапах действия низкой температуры, вероятно, преобладает первый механизм, а при действии продолжительных отрицательных температур задействованы оба механизма [37]. Ингибирование фотосинтеза в условиях низких температур может происходить и за счет нехватки Φ_n , который необходим для работы АТФ-синтазы и образования АТФ для восстановления РубФ [138]. Низкотемпературное воздействие приводит к снижению активности ферментов, участвующих в фиксации углерода [191]. Очень чувствительны к действию низких температур ферменты, участвующие в синтезе сахарозы – фруктозо-1,6-бисфосфатсинтаза, глюкозо-6-фосфатсинтаза и УДФ-глюкозопирофосфорилаза [138]. Подавление фотосинтеза в условиях низких температур выполняет важную регуляторную роль для активации холодо-зависимых генов у злаков [96, 191].

Холодовое закаливание позволяет растениям избежать ингибирования фотосинтеза [191, 206]. Это обеспечивается благодаря структурной и функциональной перестройкам хлоропластного аппарата. В ходе холодового закаливания происходит восстановление содержания хлорофиллов в ССК и возобновление скорости фотосинтеза (на 80%) [38]. Недостаток Φ_n в условиях низкой температуры компенсируется его высвобождением из

вакуолей [189]. На начальных этапах холодого закаливания (1-6 дней) в растениях озимой и яровой пшеницы наблюдали активацию генов, кодирующих Хл-*a*/Хл-*b*-связанные белки [213]. Более длительное закаливание (36 дней) озимой пшеницы приводило к подавлению экспрессии генов, кодирующих малую субъединицу Рубиско, карбоангидразу и антенные белки ФС I, и увеличению экспрессии генов, кодирующих большую субъединицу Рубиско [213]. При холодого закаливания растений арабидопсиса происходит увеличение содержания малой и большой субъединиц Рубиско, глюкозо-6-фосфатсинтазы, фруктозо-1,6-бисфосфатсинтазы, УДФ-глюкозопирофосфорилазы, белков АТФ-синтазы (субъединиц α , β , λ и γ), увеличение белков в люмене хлоропластов, связанных с работой ФС II [138, 206]. В отличие от Рубиско содержание белков ферментов цикла Кальвина (Рубиско-активаза, 3-фосфоглицераткиназа, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, фруктозо-1,6-бисфосфатаза, рибулозо-5-фосфатэпимераза и рибуло-5-фосфаткиназа) значительно снижалось по отношению к пулу белков стромы хлоропластов в течение холодого закаливания [206]. Наряду с увеличением содержания белков при закаливания к низким температурам в листьях происходило увеличение активности Рубиско, стромальной фруктозо-1,6-бисфосфатазы, седогептулозо-1,7-бисфосфатазы, НАДФ⁺-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, альдолазы, глюкозо-6-фосфатсинтазы, фруктозо-1,6-бисфосфатсинтазы, УДФ-глюкозопирофосфорилазы [138, 189]. Увеличение содержания белка и активности Рубиско свидетельствует о повышении устойчивости растений арабидопсиса к действию низких температур [206].

Таким образом, холодого закаливание способствует предотвращению ингибирования фотосинтетического аппарата хлоропластов при низких температурах и приводит к повышению устойчивости растений к фотоингибированию [191]. Сохранение фотосинтетической активности у растений в условиях низких температур очень важно, так как фотосинтез – один из факторов, от которого зависит устойчивость растений как к холоду,

так и морозу [44]. Холодовое закаливание приводит к комплексным изменениям в метаболизме дыхания и фотосинтеза, а увеличенное отношение фотосинтез/дыхание является важным условием холодового закаливания [19]. Можно предположить, что от взаимодействия хлоропластов и митохондрий зависит способность растений адаптироваться к низким температурам.

1.3. РОЛЬ МИТОХОНДРИЙ В МЕХАНИЗМАХ АДАПТАЦИИ РАСТЕНИЙ К НИЗКИМ ТЕМПЕРАТУРАМ

Митохондрии необходимы для функционирования любой эукариотической клетки, они выполняют центральную роль в углеродном и энергетическом метаболизме, выступают в качестве сигнальных органелл, участвующих в регуляции экспрессии ядерных генов и обеспечении устойчивости растений к различным стрессорам биотической и абиотической природы [88, 150, 166, 219]. В митохондриях осуществляются процессы клеточного дыхания, конечным этапом которого является высвобождение свободной энергии, которая может быть использована для синтеза АТФ [150, 219]. Дыхательная цепь митохондрий является источником АФК [71]. Согласно современным представлениям комплексы I, II и III дыхательной цепи митохондрий являются местом образования супероксид радикал-аниона ($O_2^{\bullet-}$) [149, 154, 155]. Супероксид радикал-анион образуется в результате одноэлектронного восстановления кислорода до воды, является крайне нестабильной молекулой и быстро нейтрализуется при участии супероксиддисмутазы (СОД) в пероксид водорода (H_2O_2), который может диффундировать в клетке на значительные расстояния [29]. Наиболее опасной формой АФК является гидроксил-радикал ($\bullet OH$), который образуется при высоком содержании H_2O_2 и способен окислять практически все биомолекулы, включая ДНК митохондрий [23]. В нормальных условиях избыточного накопления АФК в митохондриях не происходит, однако в стрессовых условиях образование АФК в митохондриях может быть

неконтролируемым и чрезмерным, что неизбежно приведет к повреждению макромолекул и перекисному окислению липидов [150]. В митохондриях присутствуют ферменты и низкомолекулярные соединения, непосредственно отвечающие за ликвидацию АФК.

Основную роль в снижении уровня $O_2^{\bullet-}$ в митохондриях играет СОД, которая катализирует дисмутацию свободного супероксид радикал-аниона до пероксида водорода [29, 58, 227]. В митохондриях растений локализуются Mn-СОД, расположенная в матриксе, и Cu/Zn-СОД, нейтрализующая $O_2^{\bullet-}$ в межмембранном пространстве митохондрий [29]. Митохондрии обладают полным аскарбатглутатионовым циклом, а также содержат аскарбат-глутатионредуктазу, дегидроаскорбатредуктазу, монодегидроаскорбатредуктазу и аскарбатпероксидазу, что позволяет им регулировать внутреннюю концентрацию H_2O_2 [58, 157]. Глутатионредуктаза включает семейство ферментов, использующих глутатион для детоксикации H_2O_2 и гидроперекисей липидов. Одним из ферментов данного семейства является фосфолипид-гидропероксидглутатионпероксидаза, которая действует непосредственно на гидроперекиси липидов без потребности высвобождения гидроперекисей жирных кислот [154]. В ликвидации H_2O_2 могут участвовать и пероксиредоксины, относящиеся к тиоредоксинзависимым пероксидазам [157]. Некоторыми авторами было показано присутствие в митохондриях растений каталазы, которая также участвует в детоксикации пероксида водорода [29, 50]. Митохондрии растений обладают их собственной системой тиоредоксина, которая включает два типа тиоредоксина (*o* и *h*-тип) и две формы НАД·Н-зависимой тиоредоксинредуктазы [157]. Тиоредоксин взаимодействует со многими митохондриальными ферментами и, вероятно, регулирует их активность. Известно, например, что *o*-тип и *h*-тип тиоредоксина, идентифицированные в митохондриях растений, могут взаимодействовать с АО [64, 93, 157]. При этом показано, что тиоредоксин *h*-типа участвует в восстановлении дисульфидных связей АО [64].

Важнейшими антиоксидантами митохондрий являются аскорбиновая кислота, глутатион, α -токоферол. Последний локализован в мембранах и способен неферментативно взаимодействовать с АФК, предотвращая процесс ПОЛ [29]. В удалении $O_2^{\bullet-}$ и $\bullet OH$ важную роль играют такие низкомолекулярные соединения, как аскорбат и восстановленный глутатион, которые в высоких концентрациях присутствуют в митохондриях [157].

Предотвращать генерацию $O_2^{\bullet-}$ в дыхательной цепи митохондрий растений помогают АО и разобщающие белки [71]. Их функционирование является первой линией защиты митохондрий от окислительного стресса, так как они обеспечивают регуляцию мембранного потенциала митохондрий, и могут, таким образом, уменьшить образование АФК, вызванное сверхвосстановлением дыхательной цепи [142, 157, 195]. Выявлена связь между образованием АФК и активностью АО в митохондриях растений при действии низкой температуры. Показано, что холодовое закаливание снижает дыхательную активность митохондрий и на фоне торможения ЦП может происходить сверхвосстановление убихинонового пула и образование АФК. Увеличение АФК в условиях низких температур может выполнять сигнальную функцию, активируя ряд генов [166, 197, 200, 222]. Супероксид радикал-анион вовлечен в процесс митохондриальной ретроградной регуляции, активируя экспрессию генов АО в растениях риса при низкотемпературном воздействии [166]. При холодовом закаливании на фоне торможения ЦП происходит увеличение вклада АП, связанного с функционированием АО [94], а также наблюдается увеличение транскриптов АО и содержания ее белка [94]. АО является эффективным маркером клеточного перепрограммирования при действии холодового стресса [200]. В растениях кукурузы накопление АФК в условиях низкой температуры индуцирует транскрипцию генов, кодирующих разобщающий белок PUMP (англ. "Plant Uncoupling Mitochondrial Protein") [167]. Холодовое воздействие приводит к увеличению активности таких антиоксидантных ферментов как Mn-SOD, аскорбатпероксидазы и глутатионредуктазы в растениях кукурузы

и пшеницы [131, 158]. В растениях табака при действии низкой температуры наблюдали увеличение содержания аскорбиновой кислоты, активности CuZn-СОД, гваяколпероксидазы и аскорбатпероксидазы [223]. Было показано, что активность Mn-СОД влияет на экспрессию генов *AOX1a* и *AOX1b* при действии низкой температуры [166].

Холодовое закаливание увеличивало содержание транскриптов генов *UCP1* (кодирующего разобщающий белок) и *NDB2* (кодирующего «внешнюю» НАД·Н-ДГ II типа) в растениях табака [94]. Окисление внешнего НАД·Н при низких температурах играет важную роль в поддержании энергетического гомеостаза во время холодового шока [170]. При действии низких температур происходит увеличение концентрации Ca^{2+} в митохондриях, которые участвуют в регуляции активности ферментов цикла Кребса, оказывая, таким образом, влияние на дыхательную активность митохондрий [136]. Кроме того, Ca^{2+} может регулировать активность альтернативных НАД(Ф)·Н-ДГ II типа, функционирование которых совместно с АО может влиять на уровень НАД(Ф)·Н в клетке. Гликолиз, ПФП и цикл Кребса – основные пути дыхания, которые связывают окисление субстратов с восстановлением НАД(Ф)⁺ до НАД(Ф)·Н [219]. Окисление митохондриального НАДФ·Н регулирует уровень цитозольного НАДФ·Н. НАД·Н и НАДФ·Н – центральные медиаторы восстановительной энергии между метаболическими процессами в клетках, уровень их восстановленности влияет на стресс-зависимые метаболические пути [179]. Таким образом, функционирование АО и НАД(Ф)·Н-ДГ II типа при низкой температуре может способствовать более быстрому окислению НАД(Ф)·Н, поддерживая работу НАД(Ф)⁺-зависимых ферментов и процессов.

В устойчивости растений к низкой температуре важную роль играют транспортные системы внутренней мембраны митохондрий. Анионный канал PIMAS, расположенный во внутренней митохондриальной мембране растений (англ. “Plant Inner membrane Mitochondrial Anion Channel”), вовлечен в транспорт метаболитов и может играть важную роль в

устойчивости растений к низкой температуре [204, 205]. Во внутренней мембране митохондрий кукурузы локализован белок хлоридного канала CLC (англ. “ChLoride Channel”), и обнаружена его вовлеченность в устойчивость растений к холоду, а также возможная роль в регуляции активности РИМАС [204]. Цитоскелет-связанные белки, а именно кинезин-подобный белок 1 (AtKIN14h) вовлечен в регуляцию митохондриального дыхания у проростков арабидопсиса во время холодового воздействия. AtKIN14h, взаимодействуя с белком VDAC3 (англ. “Voltage-Dependent Anion Channel”, порин) внешней митохондриальной мембраны через его хвостовой домен, вовлекается в регуляцию дыхания во время прорастания семян при низких температурах [60]. Такой тип регуляции имеет важное значение в условия низких температур, так как белки-порины регулируют транспорт АТФ/АДФ, Ca^{2+} и других метаболитов между цитозолем и митохондриями.

Во время холодового закаливания происходят изменения в жирнокислотном составе митохондриальных мембран. Происходит накопление полиненасыщенных жирных кислот в полярных липидах, что способствует сохранению необходимой текучести мембран и является фактором, который определяет активность мембраносвязанных белков, участвующих в дыхании митохондрий [57, 146]. Высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот позволяет поддерживать окислительную и фосфорилирующую активность митохондрий холодоустойчивых видов растений и способность этих органелл к изменениям объема [139, 140]. Важную роль в повышении ненасыщенности жирных кислот мембранных липидов играют десатуразы FAD2 и FAD3, локализованные в эндоплазматическом ретикулуме, которые последовательно превращают мононенасыщенную олеиновую кислоту 18:1(Δ 9) в полиненасыщенные линолевую 18:2(Δ 9,12) и далее в линоленовую 18:3(Δ 9,12,15) [46]. С использованием культур клеток арабидопсиса *fad2* (с выключенной ω -олеат десатуразной активностью) и *FAD3+* (сверхэкспрессирующего ген *FAD3* из *Brassica napus*) было доказано, что модификация полиненасыщенных

жирных кислот определяет холодоустойчивость клеток растений, влияя на микровязкость мембран и скорость дыхания митохондрий в фосфорилирующем состоянии [57]. Низкое содержание полиненасыщенных жирных кислот и сниженное отношение белок/липид в митохондриях, изолированных из *fad2* мутантов, вероятно, были причиной их сниженной холодоустойчивости и, наоборот, обогащенность α -линоленовой кислотой и повышенное отношение белок/липид в митохондриях из *FAD3+* мутантов приводили к повышенной устойчивости клеток арабидопсиса к низкой температуре [57].

1.3.1. Разветвленная дыхательная цепь митохондрий растений как механизм повышения адаптивного потенциала клеток растений

Растения, грибы, протисты, некоторые бактерии и примитивные животные содержат ряд НАД(Ф)·Н-ДГ II типа [56]. НАД(Ф)·Н-ДГ II типа являются одиночными белками с мол. массой 48-61 кД, расположенными на обеих сторонах внутренней митохондриальной мембраны [56, 178, 180]. Эти ферменты содержат нековалентно-связанный ФАД [59] и два нуклеотид-связывающих участка: N-терминальный участок (связывает ФАД) и C-терминальный участок (связывает НАД(Ф)·Н) [123].

«Внутренние» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа располагаются на внутренней митохондриальной мембране со стороны матрикса, а «внешние» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа – со стороны межмембранного пространства (рис. 5) [100, 179]. В растениях обнаружено семь генов, кодирующих ротенон-нечувствительные НАД(Ф)·Н-ДГ. Три гена кодируют белки внутренней локализации (с матриксной стороны) – *NDA1* (кодирует НАДФ·Н-дегидрогеназу), *NDA2* (предпочитительно кодирует НАД·Н-дегидрогеназу) и *NDC1* (предпочитительно кодирует НАДФ·Н-дегидрогеназу), в то время как четыре гена кодируют белки внешней локализации (со стороны межмембранного пространства) – *NDB1* (кодирует Ca^{2+} -зависимую НАДФ·Н-дегидрогеназу), *NDB2* (кодирует Ca^{2+} -зависимую НАД·Н-дегидрогеназу), *NDB3* (предпочитительно кодирует

НАД·Н-дегидрогеназу) и *NDB4* (кодирует НАД·Н-дегидрогеназу) [77, 106, 178, 179, 181].

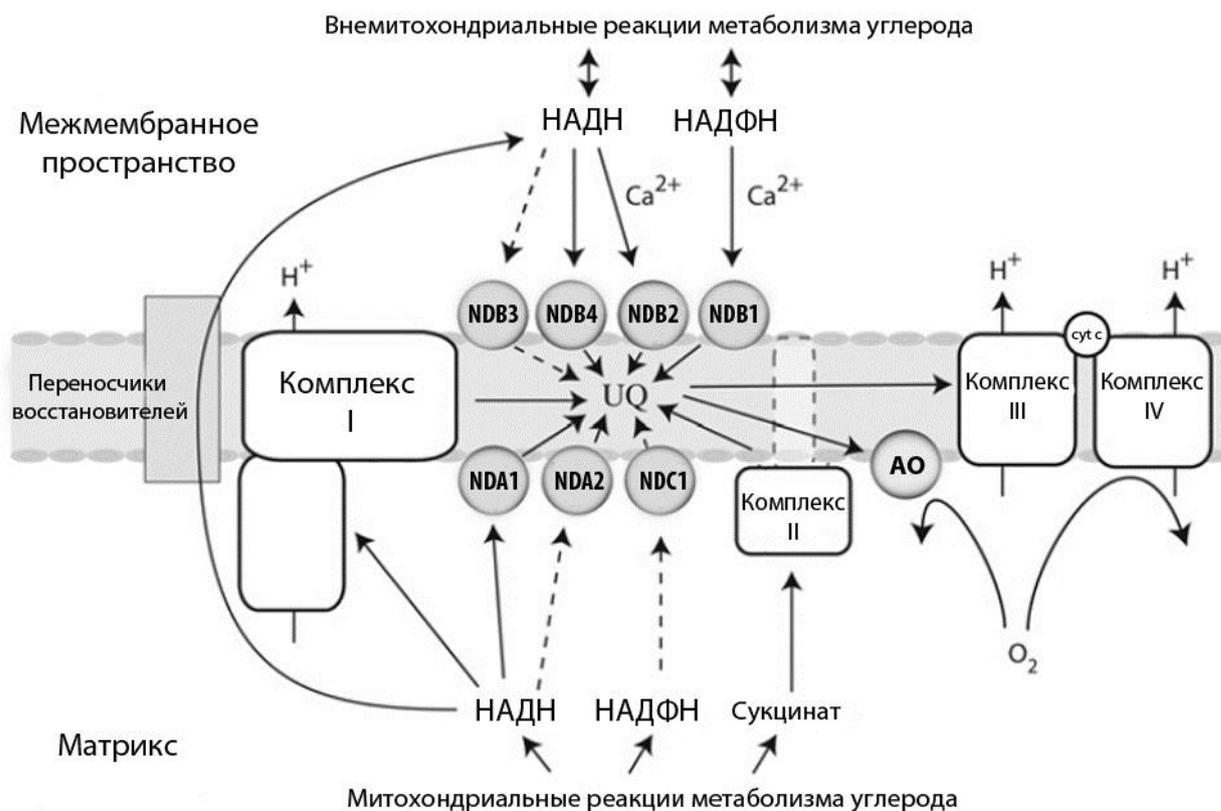


Рис. 5. Альтернативные ферменты дыхательной цепи митохондрий [179].

В растениях арабидопсиса четыре НАД(Ф)·Н-ДГ II типа имеют двойную внутриклеточную локализацию: NDC1 локализуется в митохондриях и хлоропластах, в то время как NDA1, NDA2 и NDB1 – в митохондриях и пероксисомах [215]. У НАД(Ф)·Н-ДГ II типа, имеющих двойную локализацию в митохондриях и пероксисомах, есть две отдельные сигнальные последовательности – С-терминальная для пероксисом и N-терминальная для митохондрий [215]. Регуляция активности альтернативных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ осуществляется на транскрипционном и посттрансляционном уровнях [100]. Экспрессия генов *NDA2* и *NDB2* в гетеротрофных тканях выше, чем в фотоавтотрофных [59]. Экспрессия генов *NDA1* и *NDC1* имеет световую регуляцию [77, 134]. Функционирование «внешних» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа зависит от концентрации Ca^{2+} , изменения pH и концентрации субстратов [106, 178].

АО обнаружена в растениях, прокариотах (α -протеобактерии), протистах, грибах, у некоторых видов животных [219]. АО ответвляется от цитохромного пути на уровне убихинонового пула и связывает окисление убихинола с восстановлением O_2 до H_2O [228]. АО расположена на матриксной стороне внутренней мембраны митохондрий, ее активный сайт доступен и для молекулярного кислорода, и для убихинола [100]. Согласно современным представлениям АО представляет собой биядерный ди-железосодержащий карбоксилатный белок с мол. массой от 30 до 35 кД [24, 85, 216, 217]. АО кодируется субсемействами двух генов в высших растениях – *AOX1* и *AOX2*. *AOX1* присутствует у однодольных и двудольных видов растений, в то время как *AOX2* присутствует только у двудольных [153]. В растениях арабидопсиса происходит экспрессия пяти генов, кодирующих АО (*AOX1a*, *1b*, *1c*, *1d* и *2*), при этом гены *AOX1a* и *AOX1d* – являются одними из самых стрессотзывчивых митохондриальных генов [82]. Регуляция активности АО осуществляется на генетическом и биохимическом уровнях [24, 219]. Генетический контроль экспрессии генов АО включает в себя ретроградные сигналы от митохондрий и другие сигналы клетки, связанные с ростом, энергетическим метаболизмом и стрессом. Биохимический контроль включает в себя последовательную биохимическую активацию белка АО – ковалентную модификацию, за которой следует аллостерическая активация в ответ на изменение окислительно-восстановительного уровня и уровня доступности субстратов дыхания в митохондриальном матриксе [219]. Активность АО зависит от уровня восстановленности убихинолового пула, содержания самого белка, окислительно-восстановительного статуса регулируемой дисульфид/сульфгидрильной области цистеина, вовлеченного в активацию самого фермента, и концентрации таких α -кетокислот, как пируват [100]. АО может активироваться светом через такие фоторецепторы, как фитохромы, фототропины и криптохромы [228].

Сходную с АО функцию в регуляции энергетического и метаболического баланса в клетках растений выполняют разобщающие

белки, также расположенные во внутренней мембране митохондрий [211]. UCP относятся к семейству анионных белков-переносчиков внутренней митохондриальной мембраны, и их функционирование заключается в прямом рассеивании протонного градиента в обход АТФ-синтазы [119]. UCP состоит из трех гомологичных доменов и имеет мол. массу близкую к 33 кД [78]. UCPs обнаружены в клетках животных, растений, амебовидных простейших и дрожжах. Активность UCP регулируется на уровне экспрессии генов, аллостерическим ингибированием нуклеотидами (АТФ, ГТФ) и уровнем субстратов (концентрацией анионов свободных жирных кислот на обеих сторонах митохондриальной мембраны). Кроме того, трансмембранный электрохимический потенциал (отрицательный внутри) и разность рН (кислый снаружи) влияют на циклический оборот анионов жирных кислот, переносящих H^+ [192].

Рядом авторов было показано, что функционирование энергорассеивающих систем в митохондриях (АО, НАД(Ф)·Н-ДГ II типа, UCP) необходимо для нормального развития растений [9, 56, 62, 95, 104, 151, 199, 219]. Функционирование АО и UCP вносит существенный вклад в энергетический баланс между азотным и углеродным метаболизмом. Показано, что от функционирования АО и UCP зависит скорость ассимиляции нитрата и углерода корневой системой [104]. В нормальных условиях уровень экспрессии генов, кодирующих UCP, гораздо больше, чем экспрессия генов, кодирующих АО [99]. Функционирование «внешней» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа может изменять соотношение клеточного $[НАД(Ф)·Н/НАД(Ф)^+]$, что, в свою очередь, влияет на процессы развития растений [62]. Снижение или избыточная экспрессия *NDB4* в арабидопсисе приводит к изменению фенотипа листьев [56]. АО, UCPs и альтернативные НАД(Ф)·Н-ДГ II типа вовлечены в ответ митохондрий на действие стрессоров [201]. Функционирование в митохондриях энергорассеивающих систем, таких как АО, НАД(Ф)·Н-ДГ II типа и UCP, в нормальных условиях или при стрессе взаимосвязано [56, 77, 201, 219]. Показано, что в растениях

арабидопсиса экспрессия *AOX2a* и *NDA1* зависит от функционирования хлоропластов, в то время как экспрессия *AOX1a*, *NDA2* и *NDB2* изменяется в ответ на широкий круг воздействий [77, 95, 228]. Повышение экспрессии *NDB2* и *AOX1a* в результате сниженной экспрессии *NDB4* может придавать растениям не только устойчивость к стрессу, но и влиять на их развитие и рост [56]. Под действием света происходит ко-экспрессия генов, кодирующих «внутреннюю» НАД·Н-ДГ II типа и АО [77]. В *Skunk cabbage* происходит совместная экспрессия генов, кодирующих АО и UCP, которые участвуют в термогенезе [78]. Показано, что экспрессия генов, кодирующих UCP и АО, зависит от субстрата дыхания, если в термогенных органах основным субстратом являются липиды, то индуцируется экспрессия генов UCP, если субстратом являются водорастворимые углеводы, то происходит индукция генов семейства AOX [118].

Функционирование АП позволяет поддерживать уровень окислительно-восстановительного баланса клетки и в цитозоле, и в матриксе митохондрий в ответ на различные клеточные стрессы [91].

Уровень транскриптов генов *UCP1* и *NDB2* увеличивался при действии низких температур в растениях арабидопсиса [94]. Функционирование альтернативных НАД(Ф)·Н-ДГ II типа в дыхательной цепи митохондрий способствует поддержанию окислительно-восстановительного баланса в цитозоле и матриксе митохондрий клеток растений, а это, в свою очередь, влияет на поток метаболитов через дыхательные пути. Энергорассеивающие системы способны освободить клеточное дыхание от аденилатного контроля, обеспечивая оборот пула метаболитов для биосинтеза, и увеличивать окислительный потенциал НАД(Ф)·Н в периоды высокого дыхательного потока [100].

Наиболее изученной из энергорассеивающих систем митохондрий является АО, и именно ей отводится наиболее важная роль – поддержание метаболического и сигнального гомеостаза в клетке, особенно в таких

стрессовых условиях как низкая температура, засуха, дефицит питательных веществ, а также бактериальная инфекция [71, 219].

Таким образом, можно предполагать, что наличие в митохондриях растительных клеток НАД(Ф)·Н-ДГ II типа, АО и УСР способствует поддержанию стабильной работы дыхательной цепи при действии на растения стрессоров биотической и абиотической природы.

1.3.2. Функционирование ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ и альтернативной оксидазы в митохондриях растений при действии низких температур

Существует достаточно много экспериментальных данных о функционировании АО в митохондриях растений при действии низких температур, и мало данных о функционировании при низких температурах ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ.

Показано, что в листьях картофеля содержание белка, активность и экспрессия генов, кодирующих «внутреннюю» ротенон-нечувствительную НАД·Н-ДГ (*NDA1*), снижались при холодной обработке [198], однако в листьях арабидопсиса экспрессия *NDA1* при холодной обработке, наоборот, увеличивалась [77]. При холодной обработке в растениях картофеля уровень транскриптов гена, кодирующего «внешнюю» Ca^{2+} -зависимую НАДФ·Н-ДГ (*NDB1*) не изменялся [198], а уровень транскриптов генов, кодирующих «внешнюю» Ca^{2+} -зависимую НАД·Н-дегидрогеназу (*NDB2*) и НАД(Ф)·Н-дегидрогеназу (*NDB3*) в растениях арабидопсиса увеличивался [77, 82, 94]. При выращивании растений арабидопсиса на холоде также наблюдали увеличение уровня транскриптов гена, кодирующего «внешнюю» НАД·Н-ДГ (*NDB2*), в листьях [94].

В прорастающих семенах гороха показано сохранение способности митохондрий к окислению экзогенного НАД·Н при действии отрицательной температуры на митохондрии [170]. Окисление экзогенного НАДФ·Н в листьях картофеля снижалось при холодном закаливании, а окисление

экзогенного НАД·Н не изменялось [198]. Сходные различия в активности дегидрогеназ, участвующих в окислении экзогенного НАД·Н и НАДФ·Н, при действии низких температур были обнаружены ранее в митохондриях из корнеплодов столовой и сахарной свеклы [103, 232].

Большое количество работ свидетельствует о повышении уровня транскриптов, содержания белка и активности АО под действием низких положительных температур у различных растительных объектов [57, 79, 94, 101, 102, 141, 152, 166, 168, 194, 208, 223]. В то же время существуют данные об отсутствии положительной корреляции между содержанием АО, ее активностью и холодоустойчивостью растений [194, 208]. Показано увеличение транскриптов *AOX1a*, содержания белка и увеличение активности АО в листьях арабидопсиса при холодной обработке [77, 94, 101]. Усиление экспрессии гена *AOX1a* наблюдали и после обработки растений экзогенной АБК [77, 107]. Увеличение транскриптов гена *AOX1a* и содержания белка АО при холодной обработке также наблюдали в митохондриях табака [223]. В листьях холодоустойчивого сорта озимой пшеницы при холодом закаливании происходило увеличение транскриптов генов АО – *WAOX1a* и *WAOX1c* [79, 152] и увеличение активности АО [152]. Другими авторами было показано, что в листьях картофеля активность и содержание АО при низких температурах не изменялись [198].

Изменение экспрессии генов, кодирующих АО, может происходить согласованно с изменением экспрессии генов, кодирующих UCP и NDB. Так, показано, что при холодом воздействии вместе с индукцией генов, кодирующих АО и UCP, может происходить ко-экспрессия гена, кодирующего NDB2 [77, 102]. При обработке экзогенной АБК усиление экспрессии гена *AOX1a* также происходит согласованно с *NDB2* [77]. В то же время выключение экспрессии гена *AOX1a*, кодирующего АО в растениях арабидопсиса, при низкой температуре приводит к увеличению экспрессии генов, кодирующих NDB2 и UCP [225]. Выявлена важная роль UCP в ответе на низкотемпературный стресс и предотвращении образования АФК [209].

Механизмы регуляции и функциональная роль альтернативных НАД(Ф)·Н-ДГ в условиях низких температур до сих пор остаются не изученными. А.С Свенссон с соавт. предположили, что подавление экспрессии «внутренних» НАД·Н-ДГ II типа необходимо для минимизации дальнейшего образования АФК при холодовом стрессе [198]. Функционирование АО в условиях действия низких температур, как предполагается, может быть связано с необходимостью снижения или предотвращения образования АФК [101, 166, 168]. В растениях риса со сверхэкспрессией гена, кодирующего АО, во время холодового стресса происходило снижение содержания малонового альдегида, что свидетельствует о том, что АО может способствовать снижению образования АФК и продуктов ПОЛ во время холодового стресса [166]. Увеличение активности АО важно только в начальной стадии холодовой обработки и носит временный характер [94]. На растениях арабидопсиса было показано, что пероксид водорода и ионы кальция индуцируют высвобождение этилена под действием холодового стресса, который участвует в активации АО путем увеличения содержания пирувата и экспрессии генов *AOX1a* и *AOX1c* [222]. Установлено, что АО влияет на баланс углерода и азота при низких температурах, а также на механизмы антиоксидантной защиты [223, 225]. Содержание крахмала в растениях арабидопсиса, у которых отсутствовал ген *AOX1a*, кодирующий АО, было выше, чем в растениях дикого типа [225]. Растения табака с повышенной экспрессией *AOX1a* при низкой температуре накапливали больше глюкозы и фруктозы, чем растения дикого типа, а растения с пониженной экспрессией этого гена накапливали сахаров меньше, чем растения дикого типа [223]. При снижении экспрессии *AOX1a* наблюдали уменьшение площади листа и размера розеток у растений арабидопсиса при действии низкой температуры (48 ч, 12 °С) [101], что указывает на участие АО в регуляции ростовых процессов. Сверхэкспрессия гена *AOX1a* в растениях риса приводила к повышению устойчивости корневой системы к действию низкой температуры [166].

Анализ литературных источников свидетельствует о достаточно противоречивых данных о функционировании в митохондриях растений «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ и АО при низких температурах.

1.3.3. Роль митохондрий и альтернативных путей дыхания в фотосинтезе и защите хлоропластов от фотоингибирования

Дыхательный метаболизм в фотосинтезирующих растениях тесно связан с фотосинтетическими реакциями цикла Кальвина и фотодыханием [61, 160]. Дисфункция митохондрий влияет на функциональную активность хлоропластов [73]. Когда соотношение $[НАДФ·Н/НАДФ^+]$ в хлоропластах слишком высокое, компоненты фотосинтетической ЭТЦ находятся в перевосстановленном состоянии, что увеличивает возможность образования АФК и фотоингибирования [161]. Для снижения сверхвосстановленности хлоропластного аппарата используются различные механизмы: переход из одного энергетического состояния в другое, рассеивание энергии в виде тепла, фотодыхание и ассимиляция азота [161]. Если эти механизмы не способны предотвратить сверхвосстановление, то излишек восстановительных эквивалентов может транспортироваться из хлоропластов через малат/оксалоацетатный шунт и 3-фосфоглицерат/дигидроацетонфосфатный шунт (переносчик Φ_n) в цитозоль и использоваться митохондриями [161, 228]. Такое наблюдается при избыточном освещении, которое губительно для растений и приводит к нарушениям в фотосинтетическом аппарате [95]. В условиях высокой освещенности восстановительные эквиваленты экспортируются из хлоропластов в цитозоль, вероятно, через НАДФ⁺-малатдегидрогеназный и малат/оксалоацетатный шунты, и важную роль, как полагают, в этих стрессовых условиях играет дыхательная цепь, которая рассеивает излишек восстановительных эквивалентов, образованных в хлоропластах [228]. Функционирование дыхательной цепи митохондрий при избыточном освещении необходимо для оптимизации фотосинтеза путем обеспечения

необходимого уровня АТФ в цитозоле, повышения синтеза сахарозы и рассеивания избытка восстановительных эквивалентов от хлоропластов [229]. В последние годы выявлена важная роль АО и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ в защите ЭТЦ хлоропластов от фотоингибирования при избыточном освещении [95, 117, 228, 230]. Ф. Ху с соавт. предложили механизм активации генов, кодирующих АО и НАД(Ф)·Н-ДГ II типа через фоторецепторы (рис. 6) [228].

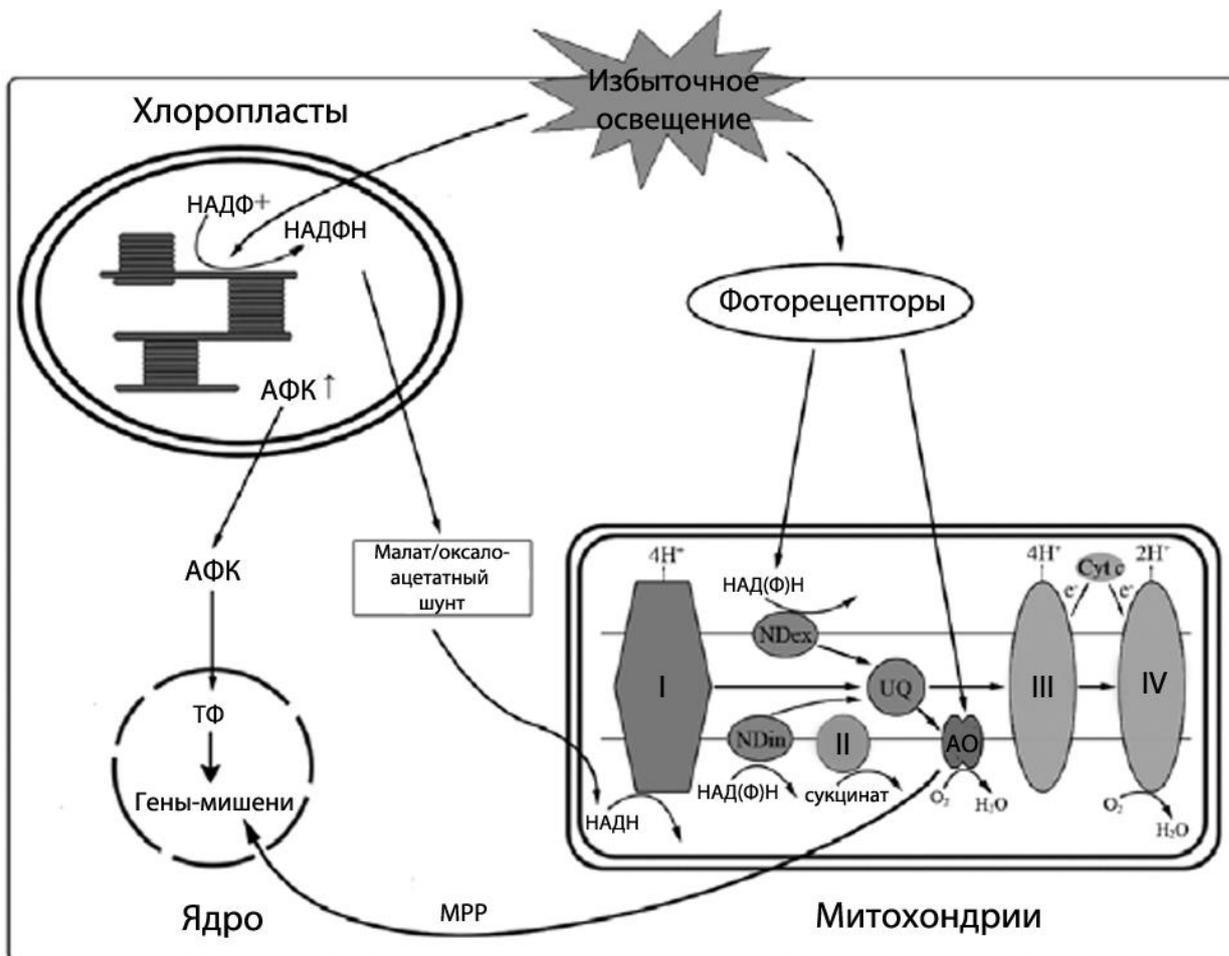


Рис. 6. Предполагаемые сигнальные пути в растительной клетке для защиты фотосинтетического аппарата от фотоингибирования при избыточном освещении [228].

Обозначения: АО – альтернативная оксидаза; АФК – активные формы кислорода; MPP – митохондриальная ретроградная регуляция; ТФ – транскрипционные факторы; NDex – «внешние» ротенон-нечувствительные НАД(Ф)·Н-дегидрогеназы; NDin – «внутренние» ротенон-нечувствительные НАД(Ф)·Н-дегидрогеназы; Cyt c – цитохром с оксидаза; I, II, III, IV – комплексы дыхательной цепи митохондрий.

Функционирование АО не только защищает фотосинтетический аппарат от фотоингибирования при избыточном освещении, но и участвует в

становлении фотосинтетического аппарата при деэтиоляции листьев [9, 95, 133]. АО может играть важную роль в начальные этапы процесса деэтиоляции через пути митохондриальной ретроградной регуляции [228]. Кроме того, АО способствует оптимизации фотосинтеза путем регуляции скоростей регенерации РубФ в условиях повышенной концентрации CO_2 [105]. От функционирования АО зависит и работа малат/оксалоацетатного шунта, активность которого в растениях арабидопсиса с пониженной экспрессией *AOX1a*, была ниже, чем в растениях дикого типа [105]. На фоне повышенной активности АО, наблюдали накопление восстановительных эквивалентов в хлоропластах и увеличение активности ферментов, необходимых для их транспорта [231]. Ингибирование активности АО приводило к сверхвосстановлению ЭТЦ хлоропластов и индуцировало циклический поток вокруг ФС I при низком потоке фотонов, а также уменьшало отношение ФС II/ФС I даже при низком потоке [229]. *In vivo* было показано, что активность АО связана с эффективностью фотосинтеза и устойчивостью к фотоингибированию [117]. Под действием света высокой интенсивности наблюдали увеличение экспрессии не только генов *AOX1a* и *NDB2* [116], но и генов *NDA1* и *NDC1* [97, 199]. Предполагается, что «внутренняя» НАД·Н-ДГ II типа играет важную роль в поддержании фотосинтетического метаболизма процессов фотодыхания [199]. Функционирование «внешней» НАДФ·Н-ДГ II типа, которая способна окислять цитозольный НАДФ·Н, экспортированный из хлоропластов, вероятно, способствует поддержанию окислительно-восстановительного баланса хлоропластов, таким образом, минимизируя фотоингибирование в течение высокого освещения [100]. В поддержании окислительно-восстановительного баланса в хлоропластах при действии света различной интенсивности важную роль играют UCPs, которые рассеивают протонный градиент, образуемый в дыхательной цепи митохондрий при окислении восстановительных эквивалентов от хлоропластов, а также участвуют в регуляции скорости ассимиляции CO_2 [151].

1.4. ВЫВОДЫ ИЗ ОБЗОРА ЛИТЕРАТУРЫ, ПОСТАНОВКА ЦЕЛИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Таким образом, анализ данных, имеющихся в литературе, показал, что митохондрии растений представляют собой органеллы, от функционирования которых зависит функциональная активность других органелл и клетки в целом. Митохондрии играют важную роль в становлении хлоропластов, а также в поддержании функционирования хлоропластов в нормальных условиях и при действии стрессоров. Так, дыхательная способность митохондрий влияет на интенсивность фотосинтеза при избыточном освещении. В этих условиях митохондрии поддерживают баланс восстановительных эквивалентов от ЭТЦ хлоропластов за счет функционирования энергорассеивающих систем, таких как АО, НАД(Ф)·Н-ДГ II типа и UCP, не допуская сверхвосстановление ЭТЦ хлоропластов и развитие окислительного стресса. Наличие такого механизма показано в условиях избыточного освещения растений арабидопсиса. В то же время поддержание интенсивности фотосинтеза особенно важно в условиях действия низких температур, поскольку увеличение отношения фотосинтез/дыхание и связанное с этим накопление растворимых сахаров – один из основных факторов эффективного повышения морозоустойчивости растений. Одними из первых на действие низкой температуры реагируют мембраны хлоропластов, изменяется их биохимический состав и структура тилакоидной системы. Увеличение вязкости тилакоидной мембраны хлоропластов при низкотемпературном воздействии оказывает негативное влияние на транспорт электронов по фотосинтетической ЭТЦ. Снижение скоростей ферментативных реакций совместно с чрезмерной световой энергией приводит к фотоингибированию ФС II. Повреждение фотосинтетического аппарата хлоропластов при низких неблагоприятных температурах может, таким образом, снижать синтез сахаров и морозоустойчивость растений. Растворимые сахара – основной субстрат

клеточного дыхания. Дыхательный метаболизм в фотоавтотрофных и гетеротрофных клетках растений отличается. Выявленные отличия в основном связаны с выбором субстратов для дыхания митохондрий и их доступностью. Активность АО также зависит от содержания сахаров и от субстрата дыхания. Экспрессия генов, кодирующих АО и НАД(Ф)·Н-ДГ II типа, зависит от типа растительной ткани. Дыхательный метаболизм изменяется при холодовом закаливании, происходит изменение активности ферментов гликолиза, ПФП и цикла Кребса, снижается интенсивность дыхания. На фоне ингибирования цитохромного пути при действии низких температур усиливается вклад АО в дыхание. Скорость окисления «внешнего» НАД·Н в гетеротрофных тканях в условиях низких температур не снижается. Можно предполагать, что функционирование АО и НАД(Ф)·Н-ДГ II типа у растений при низкой температуре играет важную роль не только в гетеротрофных тканях, но и в фотоавтотрофных. Проведенный анализ источников литературы позволяет говорить о том, что активность ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-ДГ II типа в условиях действия низких температур мало изучена, а в озимых злаках вообще не изучена. Отсутствуют данные о связи активности АО и НАД(Ф)·Н-ДГ II типа в фотоавто- и гетеротрофных тканях озимых злаков с содержанием сахаров и развитием морозоустойчивости.

В связи с недостаточной изученностью митохондриальных систем, ответственных за несопряженное с синтезом АТФ дыхание, в клетках растений при низкой температуре, была определена **цель** диссертационной работы, которая заключалась в сравнительном анализе функционирования альтернативной оксидазы и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ в митохондриях этиолированных и зеленых побегов озимой пшеницы и выяснении возможных механизмов регуляции их активности.

2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования

В работе были использованы этиолированные и зеленые растения озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Иркутская. Сорт Иркутская получен в Сибирском институте физиологии и биохимии растений СО РАН путем отбора наиболее морозоустойчивых и зимостойких образцов из коллекции линий озимой пшеницы, полученных из Института цитологии и генетики СО РАН [15]. Учитывая высокую морозоустойчивость и зимостойкость, этот сорт озимой пшеницы был использован в данном исследовании.

Семена озимой пшеницы перед проращиванием промывали мыльным раствором. Хорошо промытые водой семена заливали 0,1% раствором перманганата калия, в котором выдерживали в течение 20 минут и затем снова промывали водой.

Этиолированные проростки. Для получения этиолированных проростков семена проращивали в кюветах на влажной фильтровальной бумаге в темноте в термостатируемой камере при 25 ± 1 °C в течение 3 суток. Контрольные проростки использовали в возрасте 3 суток. Для анализа брали побеги проростков.

Этиолированные и зеленые растения. Для проращивания этиолированных и зеленых растений пшеницы, промытые после обработки перманганатом калия семена заливали водой и оставляли набухать при 25 ± 1 °C в течение суток. Набухшие семена хорошо промывали, воду полностью сливали, контейнер с семенами накрывали крышкой и снова выдерживали в темноте при 25 ± 1 °C в течение суток. Промытые проклюнувшиеся семена проращивали на полипропиленовой сетке в контейнере в темноте на воде в течение суток при 25 ± 1 °C. Для получения этиолированных растений контейнер переносили в камеру MIR-154 (“Sanyo”, Япония) с температурой 22 ± 1 °C, а для зеленых – в камеру KBW 720 (“Binder”, Германия) с

температурой $23/20 \pm 0,1$ °C (16 ч фотопериод) и освещенностью 250 мкмоль/($m^{-2} \cdot c^{-1}$) фотосинтетической активной радиации (ФАР). Через двое суток выращивания растения переносили на $1/2$ раствор Кнопа и выращивали их в течение последующих 4-6 суток. Контрольные этиолированные растения использовали в возрасте 7,5 суток, а зеленые – в возрасте 9 суток. Для анализа брали листья растений.

2.2. Температурная обработка и обработка сахарозой

Этиолированные проростки. Для прохождения холодового закаливания 3-х суточные этиолированные проростки озимой пшеницы переносили в инкубатор с температурой 2 °C на 7 суток. Закаливание проводили в темноте.

Этиолированные и зеленые растения. Для обработки сахарозой или/и низкой закаливающей температурой использовали 7-ми суточные этиолированные и зеленые растения озимой пшеницы. В работе применяли раствор 12 %-ой сахарозы, концентрация которого наиболее эффективна для холодового закаливания озимой пшеницы [44]. Для обогащения сахарами в контрольных условиях (22 °C) этиолированные и зеленые растения помещали на раствор сахарозы и выдерживали их в темноте в течение 7 суток (К+Сах), меняя раствор сахарозы ежедневно. Холодовое закаливание этиолированных и зеленых растений осуществляли в течение 7 суток. Этиолированные растения закаливали в темноте при 2 °C на $1/2$ растворе Кнопа (Т) и в темноте при 2 °C на 12 %-ом растворе сахарозы (Т+Сах). Зеленые растения пшеницы закаливали при следующих условиях: а) при $5/2$ °C (16 ч фотопериод) на $1/2$ растворе Кнопа и освещенности 200 мкмоль/($m^{-2} \cdot c^{-1}$) ФАР (Св(16)); б) при 5°C (24 ч фотопериод) на $1/2$ растворе Кнопа и освещенности 200 мкмоль/($m^{-2} \cdot c^{-1}$) ФАР (Св(24)); в) в темноте при 2 °C на $1/2$ растворе Кнопа (Т); и г) в темноте при 2 °C на растворе 12 %-ой сахарозы (Т+Сах).

Температурную обработку проводили в камерах KBW 720 и KBW 400 (“Binder”, Германия) и инкубаторах MIR-153 и MIR-154 (“Sanyo”, Япония).

2.3. Определение степени ингибирования роста проростков и растений

Этиолированные проростки. Для определения степени ингибирования роста измеряли длину побегов проростков до закаливания (3 суток) и через 7 суток после действия низкой закаливающей температуры. 10-ти суточные проростки, выращенные в контрольных условиях, были использованы в качестве контроля.

Этиолированные растения. Для определения степени ингибирования роста измеряли длину побегов растений озимой пшеницы до закаливания (7 суток) и через 7 суток действия низкой закаливающей температуры и/или выращивания на растворе сахарозы. 14-ти суточные этиолированные растения, выращенные при 22 ± 1 °С на $\frac{1}{2}$ растворе Кнопа, служили контролем.

Зеленые растения. Для определения степени ингибирования роста измеряли длину побегов растений озимой пшеницы до закаливания (7 суток) и через 7 суток действия низкой закаливающей температуры и/или выращивания на растворе сахарозы. 14-ти суточные зеленые растения, выращенные при $23/20\pm 0,1$ °С (16 ч фотопериод) на $\frac{1}{2}$ растворе Кнопа, служили контролем для закаленных на свету растений. 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 на $\frac{1}{2}$ растворе Кнопа, служили контролем для закаленных в темноте растений и растений, выращенных на сахарозе в контрольных условиях.

Для характеристики степени угнетения ростовых процессов, определяли степень ингибирования роста побегов (I, %) по формуле: $I = (\Delta Lk - \Delta Lt) / \Delta Lk \times 100\%$, где ΔLk – средний прирост побегов, не подвергнутых обработке; ΔLt – средний прирост побегов, подвергнутых обработке [16].

2.4. Определение морозоустойчивости

Относительную морозоустойчивость озимой пшеницы определяли

путем степенчатого промораживания образцов [33]. Для этого контрольные и закаленные этиолированные проростки промораживали при температурах -4 , -6 , -8 , -10 , -12 , -14 , -16 °C, а контрольные и закаленные этиолированные и зеленые растения – при температурах -4 , -6 , -8 , -10 , -12 , -14 , -16 , -18 , -20 °C (продолжительность промораживания при каждой температуре составляла 24 ч). Проростки и растения во влажных марлевых мешочках по 30-50 штук в трех повторностях помещали в пластиковые контейнеры. Промораживание осуществляли в камере МКТ-240 (“Binder”, Германия). Снижение температуры происходило раз в сутки со скоростью 1 °C/ч. Морозоустойчивость определяли с помощью подсчета выживших проростков и растений после отрастания. После действия отрицательных температур этиолированные проростки переносили в камеру с температурой 2 °C на 2 суток, а затем в камеру с температурой 25 ± 1 °C. Промороженные этиолированные и зеленые растения переносили в камеру с температурой 2 °C на сутки, а затем в темноту в камеру с температурой 22 °C (в случае этиолированных) и в камеру с температурой $23/20 \pm 0,1$ °C (16 ч фотопериод) (в случае зеленых растений). Подсчет количества выживших проростков и растений проводили через 7 суток после промораживания. В экспериментах по морозоустойчивости анализировался параметр LT_{50} – температура, вызывающая гибель 50% растений. LT_{50} вычисляли на основе пробит-анализа с помощью IBM SPSS Statistics 21.0. Точность оценки LT_{50} описывали с помощью 95% доверительного интервала (ДИ) с указанием его верхней и нижней границы [22].

2.5. Определение содержания водорастворимых углеводов

Количественное содержание водорастворимых углеводов в этиолированных проростках и листьях этиолированных и зеленых растений определяли с использованием 0,2% антрона в концентрированной H_2SO_4 [14]. Для этого проростки или листья высушивали до постоянного веса при температуре 70 °C, растирали в ступке до порошкообразного состояния и

водорастворимые углеводы из сухого растительного материала экстрагировали горячей водой. Затем пробирки с экстрактом оставляли в термостатируемой камере при 25 ± 1 °C на сутки. К отобраным аликвотам супернатанта добавляли удвоенный объем антрона в концентрированной H_2SO_4 , выдерживали 15 минут и плотность окрашенного комплекса измеряли спектрофотометрически при 620 нм. В качестве контроля использовали воду с антроном в концентрированной H_2SO_4 . Содержание водорастворимых углеводов рассчитывали по калибровочной кривой, построенной по сахарозе. Данные представляли в % от воздушно-сухого веса.

Содержание воды в растительной ткани определяли в процентах от сырого веса, исходя из отношения разности сырого и сухого веса, отнесенного к сырому весу.

2.6. Выделение и очистка митохондрий

2.6.1. Выделение митохондрий из этиолированных проростков

Выделение митохондрий из проростков проводили в криостате при 2-4 °C по ранее описанной методике [28] с некоторыми изменениями. Растительную ткань разрушали с помощью пресса, используя среду выделения (СВ), в соотношении 1 : 3 (растительный материал, г : среда выделения, мл). Для выделения митохондрий использовали среду, содержащую 300 мМ сахарозу, 40 мМ MOPS-КОН (pH 7,4), 10 мМ KCl, 2 мМ ЭДТА, 1 мМ $MgCl_2$, 0,5% цистеин и 0,1% БСА. Гомогенат отжимали через капроновую ткань и центрифугировали при 5000 g в течение 4 мин. Затем осадок отбрасывали, а супернатант центрифугировали при 15000 g в течение 4 мин. Полученный осадок митохондрий промывали средой промывания (СП), содержащей те же компоненты, что и СВ, за исключением цистеина. Затем промытые митохондрии повторно осаждали при 15000 g в течение 4 мин и полученный осадок ресуспендировали в СП, из состава которой исключали БСА. Изолированные митохондрии использовали для дальнейшей очистки.

Очистку митохондрий осуществляли с использованием ступенчатого градиента перколла, приготовленного на среде, содержащей 300 мМ сахарозу, 10 мМ MOPS-KOH (pH 7,4) и 0,1% БСА. Градиент состоял из 25 и 8 мл 23 и 35% (v/v) перколла, соответственно (рис. 7).

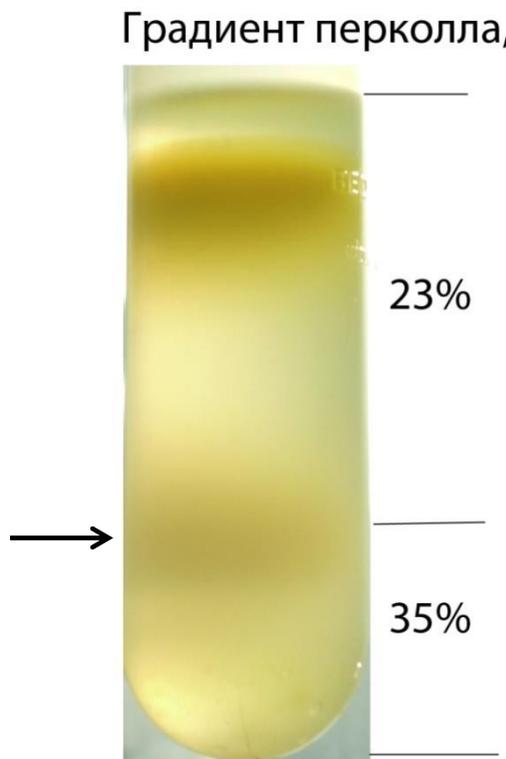


Рис. 7. Получение митохондрий из этиолированных побегов проростков озимой пшеницы путем очистки грубой митохондриальной фракции в градиенте перколла (23/35%).

Суспензию промытых митохондрий (60-90 мг белка) ресуспендировали в 1-1,5 мл среды ресуспендирования (СР), состоящей из 300 мМ сахарозы и 40 мМ MOPS-KOH (pH 7,4), наслаивали на градиент перколла и центрифугировали при 24500 g в течение 45 мин. Фракция интактных митохондрий находилась на границе 23 и 35% перколла. Митохондрии промывали от перколла, разбавляя его в 20 раз СР (v/v). Осаждение митохондрий из разбавленной суспензии проводили при 24500 g в течение 10 мин. Осадок очищенных митохондрий повторно промывали 10 объемами СР и осаждали в течение 5 мин при 24500 g. После ресуспендирования очищенные митохондрии (5-10 мг белка) хранили в пробирке на льду при 2-4

°C и использовали для полярографического анализа, или замораживали в жидком азоте и использовали для выделения белков.

2.6.2. Выделение митохондрий из листьев зеленых и этиолированных растений

Выделение митохондрий из листьев зеленых и этиолированных растений озимой пшеницы осуществляли с помощью дифференциального центрифугирования. Все этапы по выделению и очистке митохондрий проводили при 2-4 °C по описанной методике [34, 133]. Растительную ткань растирали в охлажденной ступке на льду со средой выделения в соотношении 1 : 4 (растительный материал, г : среда выделения, мл). Для выделения митохондрий из листьев были использованы среды по Keech с соавторами [122] с некоторыми модификациями. Среда выделения содержала 300 мМ сахарозу, 40 мМ MOPS-KOH (pH 8,0 – для зеленых, pH 7,5 – для этиолированных листьев), 2 мМ ЭДТА, 10 мМ KH_2PO_4 , 1 мМ глицин, 1% поливинилпирролидон-40 (водорастворимый) (ПВП-40), 50 мМ аскорбат, 20 мМ цистеин и 0,5% БСА. Гомогенат отжимали через капроновую ткань и центрифугировали сначала 10 мин при 3000 g, а затем супернатант центрифугировали еще 5 мин при 3000 g. Митохондрии из супернатанта осаждали центрифугированием при 15000 g в течение 15 мин. Осадок митохондрий промывали средой промывания (СП), содержащей 300 мМ сахарозу, 10 мМ MOPS-KOH (pH 7,5) и 10 мМ KH_2PO_4 с добавлением 0,5% БСА. Митохондрии повторно осаждали, ресуспендировали их в СП (40-90 мг белка) и наслаивали на градиент плотности перколла, приготовленном на среде, содержащей 300 мМ сахарозу, 10 мМ MOPS-KOH (pH 7,5), 0,25% ПВП-40 и 0,1% БСА. Градиент состоял из 22, 8 и 6 мл 28, 45 и 60% (v/v) перколла, соответственно (рис. 8). Процентность растворов перколла была взята из статьи [159]. Нанесенную на градиент перколла суспензию митохондрий центрифугировали при 24500 g в течение 60 мин. Фракцию интактных митохондрий, локализованную в нижней части 28% перколла на

границе с 45%, освобождали от перколла, разбавляя его СП в 20 раз и осаждали при 24500 g в течение 15 мин. Осадок митохондрий повторно промывали 10 объемами СП и переосаждали в течение 5 мин при 24500 g. Суспензию очищенных митохондрий (0,3-0,8 мг белка) ресуспендировали в СП, хранили на льду при 2-4 °С и использовали для полярографического анализа или замораживали в жидком азоте и использовали для выделения белков.

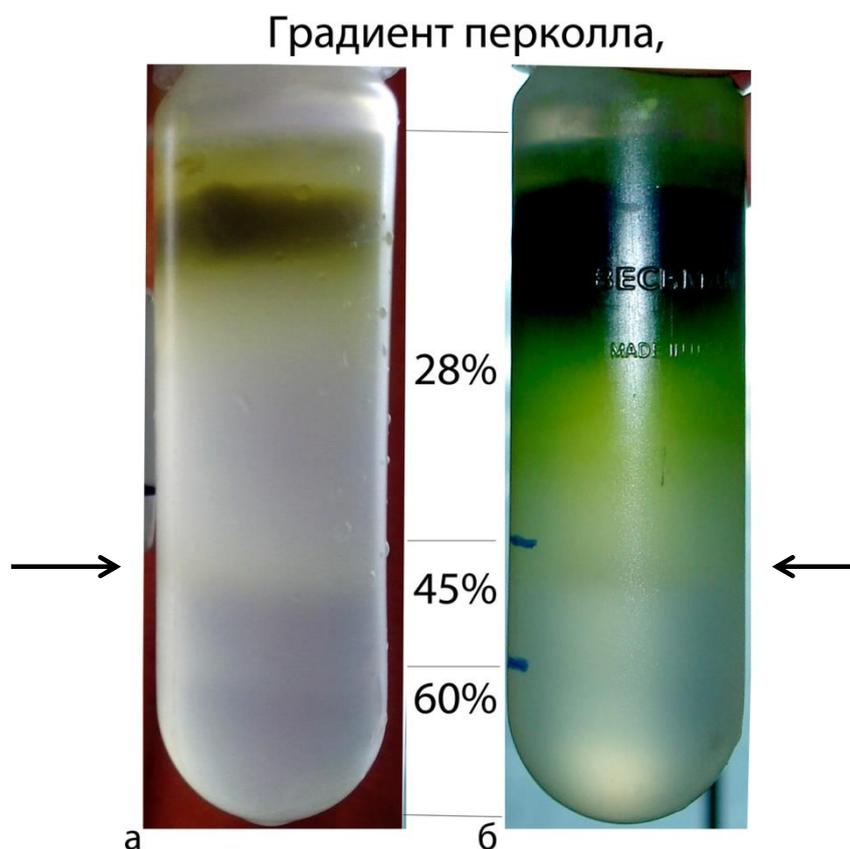


Рис. 8. Получение митохондрий из этиолированных (а) и зеленых (б) листьев озимой пшеницы путем очистки грубой митохондриальной фракции в градиенте перколла (28/45/60%).

Количество белка в суспензии митохондрий, изолированных из проростков и листьев озимой пшеницы, определяли по методу Лоури [137]. Все указанные центрифугирования осуществляли в центрифуге Allegra 64 R (“BECKMAN COULTER”, США).

2.6.3. Определение интактности изолированных митохондрий

Интактность внешней митохондриальной мембраны рассчитывали по разнице скорости аскорбат-зависимого стимулируемого цитохромом *c* KCN-чувствительного поглощения кислорода [51] в отсутствие и в присутствии 0,04% Тритона X-100 [89]. Для оценки интактности использовали следующие реагенты в их конечной концентрации: 60 мМ аскорбат, 30 мкМ цитохром *c*, 0,4 мМ цианид калия (KCN) (для митохондрий из проростков) или 1,2 мМ KCN (для митохондрий из листьев).

2.6.4. Определение степени загрязненности митохондрий хлоропластами

О загрязнении митохондриальной фракции из зеленых листьев хлоропластами судили по содержанию хлорофилла в митохондриальной суспензии. Содержание хлорофилла (сумма Хл *a* и *b*) в грубой и очищенной фракциях митохондрий определяли спектрофотометрически при длине волны 652 нм после экстракции 80% ацетоном по формуле Арнона [63]. Содержание хлорофилла в очищенной митохондриальной фракции было низким и составляло всего 0,04-0,20 мкг/мл⁻¹ (3-6% от содержания хлорофилла в грубой фракции).

2.7. Определение окислительной и фосфорилирующей активности митохондрий

Окислительную и фосфорилирующую активность очищенных из проростков и листьев 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. Митохондрии добавляли в полярографическую ячейку со средой инкубации, в которую был внесен субстрат окисления. Для инициирования окислительной и фосфорилирующей активности митохондрий в ячейку вносили АДФ.

Конечная концентрации добавленного АДФ составляла 100-200 мкМ. В работе в качестве ингибиторов дыхания использовали KCN и бензгидроксамовую кислоту (БГК), которые добавляли в состоянии 3 (V_3).

Для определения энергетической активности рассчитывали параметры окисления и фосфорилирования митохондрий: состояние 3 (V_3) – скорость поглощения O_2 при фосфорилировании АДФ (нмоль O_2 /(мин · мг белка)); состояние 4 (V_4) – скорость поглощения O_2 после истощения АДФ (нмоль O_2 /(мин · мг белка)) [98]; коэффициент дыхательного контроля по Чансу и Вильямсу ($KDK=V_3/V_4$) – отношение скорости дыхания в состоянии 3 к скорости дыхания в состоянии 4 в данном цикле фосфорилирования [76]; отношение АДФ:О – отношение фосфорилированного АДФ к количеству утилизированного при этом кислорода (нмоль АДФ/наноатомы кислорода) [98].

2.7.1. Определение окислительной и фосфорилирующей активности митохондрий из этиолированных проростков

Для изучения дыхательной активности митохондрий, изолированных из проростков, использовали среду инкубации, содержащую 300 мМ сахарозу, 10 мМ KCl, 18 мМ KH_2PO_4 (pH 7,4), 1 мМ $MgCl_2$, 5 мМ ЭДТА, 0,3 % БСА. В качестве субстратов дыхания использовали: 10 мМ малат в присутствии 10 мМ глутамата; 10 мМ малат в присутствии 10 мМ глутамата и 3 мкМ ротенона; 8 мМ сукцинат в присутствии 5 мМ глутамата и 3 мкМ ротенона; 1 мМ НАД·Н; 1 мМ НАДФ·Н. Глутамат использовали для устранения оксалоацетатного ингибирования. Ротенон вносили для ингибирования транспорта электронов через комплекс I ЭТЦ. Функционирование «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа оценивали по окислению малата в присутствии ротенона, функционирование «внешних» НАД·Н-ДГ или НАДФ·Н-ДГ II типа – по окислению экзогенного НАД·Н или НАДФ·Н, соответственно, в присутствии 3 мкМ ротенона и 0,06 мМ Ca^{2+} . При окислении НАД·Н и НАДФ·Н из среды исключали ЭДТА. Для

ингибирования ЦП использовали 0,4 мМ KCN (ингибитор цитохром *c* оксидазы), для ингибирования АП – 1 мМ БГК (ингибитор АО). Вклад ЦП рассчитывали как дыхание, ингибируемое KCN, и выражали в нмолях O₂/(мин · мг белка) и в % от скорости окисления субстратов в состоянии 3. Вклад АП, связанного с функционированием АО, рассчитывали как дыхание, ингибируемое БГК в отсутствие KCN (реальный вклад АО) или БГК в присутствии KCN (потенциальная активность АО), и выражали в нмолях O₂/(мин · мг белка) и в % от скорости окисления субстратов в состоянии 3. Максимальную активность АО оценивали последовательным добавлением KCN и БГК в присутствии в реакционной среде 1 мМ пирувата и 5 мМ ДТТ. Концентрацию ингибиторов подбирали путем титрования [53] скорости дыхания митохондрий KCN (0,1-1,6 мМ) и БГК (0,1-3 мМ).

2.7.2. Определение окислительной и фосфорилирующей активности митохондрий из этиолированных и зеленых листьев

Для изучения дыхательной активности митохондрий, изолированных из листьев, использовали реакционную среду, содержащую 300 мМ сахарозу, 18 мМ KН₂РO₄ (рН 7,4), 125 мМ КСl, 5 мМ ЭДТА и 0,3% БСА. В качестве субстратов окисления использовали такие же субстраты, как и при дыхании митохондрий из этиолированных проростков. При окислении НАД·Н и НАДФ·Н из среды также исключали ЭДТА.

Для изучения окислительной активности митохондрий из зеленых листьев использовали 10 мМ глицин в присутствии 0,2 мМ НАД⁺. Для ингибирования ЦП использовали 1,2 мМ KCN, для ингибирования АП – 3 мМ БГК. Вклад ЦП рассчитывали как дыхание, ингибируемое KCN, и выражали в нмолях O₂/(мин · мг белка). Вклад АП, связанного с функционированием АО, рассчитывали как дыхание, ингибируемое БГК в присутствии KCN (потенциальная активность АО), и выражали в нмолях O₂/(мин · мг белка). Концентрацию ингибиторов подбирали путем

титрования [53] скорости дыхания митохондрий KCN (0,1-2,4 мМ) и БГК (0,1-6 мМ).

2.8. Определение содержания активных форм кислорода в митохондриях

Содержание АФК в изолированных из этиолированных проростков митохондриях определяли с использованием красителя 2', 7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата ($H_2DCF-DA$). Это неполярное соединение легко проходит внутрь клетки и с помощью эстераз превращается в полярное производное H_2DCF . H_2DCF сам по себе не является флуоресцентным, но быстро окисляется в высоко флуоресцентный DCF при реакции с внутриклеточными АФК [142, 202]. $H_2DCF-DA$ растворяли в этаноле и добавляли к митохондриям в конечной концентрации 1 мкМ. Митохондрии инкубировали в течение 1-2 мин в среде, содержащей 300 мМ сахарозу, 20 мМ MOPS (pH 7,4), 5 мМ $MgCl_2$, 10 мМ ЭДТА и различные ингибиторы ЭТЦ. Использовали следующие ингибиторы: 20 мкМ антимицин А (ингибитор комплекса III дыхательной цепи), 3 мкМ ротенон (ингибитор комплекса I дыхательной цепи), 0,4 мМ KCN (ингибитор комплекса IV дыхательной цепи) и 1 мМ БГК и СГК (ингибиторы АО). Затем в среду с митохондриями добавляли $H_2DCF-DA$ и инкубировали в течение 25 мин при 26 °С на термошейкере TS-100 ("Biosan", Латвия). После инкубации митохондрии осаждали центрифугированием при 13000 g в течение 5 мин в микроцентрифуге MiniSpin ("Eppendorf", Германия), супернатант сливали и использовали для анализа. Флуоресценцию DCF измеряли спектрофлуориметрически на приборе RF-5301PC ("Shimadzu", Япония). Свет с длиной волны 480 нм использовали для возбуждения флуоресценции, а испускание регистрировали на длине волны 524 нм. Содержание АФК рассчитывали в относительных единицах (отн. ед.) флуоресценции DCF на мг митохондриального белка. Компоненты реакции без митохондрий были использованы как отрицательный контроль. Для определения специфичности

действия H₂DCF-DA суспензию митохондрий инкубировали с H₂DCF-DA в присутствии прооксиданта – 1 мМ H₂O₂ или в присутствии антиоксиданта – 60 мМ аскорбиновой кислоты. Также специфичность действия H₂DCF-DA проверяли, используя суспензию митохондрий, предварительно подвергнутых тепловой денатурации (70 °С, 10 мин).

2.9. Выделение суммарного и митохондриального белка

2.9.1. Выделение суммарного белка

Для выделения суммарного клеточного белка навеску растительного материала (1 г проростков или листьев) растирали в ступке с жидким азотом до порошкообразного состояния и гомогенизировали в буфере, содержащем 100 мМ Трис-НСl (рН 7,4), 1 мМ β-меркаптоэтанол и 0,5-1 мМ фенилметилсульфонилфлюорид в соотношении 1 : 4 (растительный материал, г : буфер для гомогенизации, мл) [28]. Полученный гомогенат центрифугировали при 20000 g в течение 20 мин. Затем супернатант сливали в чистые пробирки, добавляли к нему двухкратный объем охлажденного ацетона и оставляли в морозильной камере на 30 минут. Затем белок осаждали центрифугированием при 10000 g в течение 10 мин и растворяли в 400 мкл буфера для образца (“Sample Buffer”, SB), который включал 62,5 мМ Трис-НСl (рН 6,8), 1 мМ ЭДТА, 1% ДДС-Na, 20% глицерин, 5% β-меркаптоэтанол и 0,001% бромфеноловый синий. Растворенный в SB осадок белка инкубировали на водяной бане при 97 °С в течение 5 мин, затем центрифугировали 15 мин при 10000 g. Супернатант, содержащий водорастворимый тотальный клеточный белок, использовали для электрофоретического разделения и вестерн-блоттинга. Вышеперечисленные центрифугирования осуществляли в центрифугах Allegra 64 R (“BECKMAN COULTER”, США) и MiniSpin (“Eppendorf”, Германия).

2.9.2. Выделение митохондриального белка

К суспензии изолированных митохондрий добавляли дитиотреитол (ДТТ) в конечной концентрации 50 мМ и инкубировали на льду в течение 60 мин. Добавление ДТТ в такой концентрации позволяет детектировать восстановленную форму АО [94]. Затем митохондрии осаждали центрифугированием при 13000 g в течение 15 мин. К полученному осадку добавляли SB и инкубировали на водяной бане при 97 °С в течение 5 мин. После центрифугирования при 10000 g в течение 15 мин супернатант, содержащий водорастворимый тотальный митохондриальный белок, использовали для последующего электрофореза и вестерн-блоттинга. Центрифугирования проводили в центрифуге MiniSpin (“Eppendorf”, Германия).

2.10. Электрофорез в ПААГе с ДДС-Na

Электрофорез проводили в 12,5% ПААГе с ДДС-Na в модифицированной системе Лэммли [126], используя прибор для электрофореза Mini-PROTEAN III Electrophoretic Cell (“Bio-Rad”, США). Стеклопластины (83×102 и 73×102 мм) вставляли в устройство для заливки геля и в просвет между стеклами заливали мелкопористый полиакриламидный гель. После его полимеризации заливали крупнопористый гель, в который погружали зубчатый шаблон для формирования карманов, необходимых для нанесения белковых проб. Верхний и нижний буфер имели одинаковый состав, и состояли из 25 мМ Трис-HCl (pH 8,3), 192 мМ глицина и 0,01% ДДС-Na. Разделяющий гель полимеризовали в 375 мМ Трис-HCl буфере (pH 8,8), а концентрирующий гель в 125 мМ Трис-HCl буфере (pH 6,8). Оба геля содержали 0,01% ДДС-Na. Разделяющий гель имел концентрацию 12,5% полиакриламида [28]. Анализируемые белки в равной концентрации (не более 30-50 мкг белка) вносили в карманы концентрирующего геля. Первые полчаса, когда образцы входили в концентрирующий гель, устанавливали напряжение 50 В на блок.

Затем электрофорез проводили при напряжении 180 В, пока свидетель (бромфеноловый синий) не доходил до конца разделяющего геля. После окончания электрофореза гель извлекали и помещали или в камеру для окрашивания с 0,1% Кумасси, или использовали для вестерн-блоттинга.

Гель окрашивали в растворе, содержащем 0,1% Кумасси, 25% изопропанол, 10% уксусную кислоту. Для обесцвечивания фона геля использовали раствор, содержащий 7% уксусную кислоту и 12,5% изопропанол.

2.11. Вестерн-блоттинг

Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (“GE Healthcare”, Швеция или “Sigma”, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя в буфере, содержащем 25 мМ Трис-НСl (рН 8,3), 192 мМ глицин и 10% метанол, в специальном приборе для блоттинга Mini Trans-Blot (“Bio-Rad”, США). Перенос проводили в холодильной комнате в течение 2,5 ч, выставив силу тока на источнике питания 360 мА. После переноса белков на нитроцеллюлозную мембрану ее извлекали из прибора, помещали в водный раствор 0,1% уксусной кислоты, содержащий 0,5% Понсо, и отмечали маркерные белки и направление треков. Затем мембрану тщательно отмывали от Понсо дистиллированной водой и помещали на 12 ч при 4 °С в блокирующий раствор, содержащий 2-3% сухое обезжиренное молоко, 0,2% азид натрия, 10 мМ Трис-НСl (рН 7,4) и 150 мМ NaCl (трис-солевой буфер – ТСБ). От блокирующего раствора мембрану отмывали дважды ТСБ в течение 20 мин на минирокере MR-1 (“BioSan”, Латвия). Затем мембрану инкубировали с первичными антителами в течение 1-6 ч. В работе использовали следующие антитела: против дегидринов в разведении 1 : 1000 (ADI-PLA-100, “StressGen”, США), против порина (PORIN) в разведении 1 : 100 (любезно предоставлены Prof. T. Elthon, University of Nebraska, США), против АО в разведении 1 : 100 (AS10 699, “Agriseria”, Швеция), против «внутренних» (NDA) и «внешних» (NDB) ротенон-нечувствительных

НАД(Ф)·Н-ДГ II типа в разведении 1 : 1000 (любезно предоставлены Prof. A. Rasmusson, Lund University, Швеция) [180].

После инкубации с первичными антителами мембрану отмывали 2 раза по 10 мин от несвязавшихся антител в ТСБ, содержащем 0,05% Твин-20 (ТТСБ). Затем нитроцеллюлозную мембрану помещали в раствор вторичных антител, конъюгированных со щелочной фосфатазой, и инкубировали в течение 1-3 ч на минирокере. Использовали следующие вторичные антитела: антимышьиные в разведении 1 : 1000 («Sigma», США), антикроличьи в разведении 1 : 2500 («Sigma», США или «Promega», США) и антикроличьи в разведении 1 : 30000 («Sigma», США). После инкубации со вторичными антителами мембрану отмывали 3 раза по 5 мин ТТСБ от непрореагировавших антител и помещали в раствор, содержащий 100 мМ Трис-НСl (рН 9,5), 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂. Затем мембрану окрашивали в Трис-НСl-буфере с рН 9,5, который содержал 0,17 мг/мл 5-бromo-4-хлоро-3-индолил фосфата и 0,33 мг/мл нитротетразолия синего. Относительную интенсивность окрашивания белковых полос изучали с помощью программы Gel Analysis (Gel Doc, «Bio-Rad», США). Интенсивность окрашивания рассчитывали в % по отношению к порину, который использовали как внутренний контроль [94].

2.12. Список используемых реактивов

АДФ – «Sigma» (США); акриламид – «GERBU» (Германия); антимицин А – «Sigma» (США); антрон – «Sigma-Aldrich» (Испания); аскорбиновая кислота – «Sigma-Aldrich» (Германия); БГК – «Sigma-Aldrich» (США); БСА – «Sigma-Aldrich» (США); 5-бromo-4-хлоро-3-индолил фосфат – «Sigma» (США); глицин – «GERBU» (Германия); глутамат – «Sigma» (Германия); ДДС-Na – «MP Biomedicals Inc.» (Франция); ДТТ – «Sigma-Aldrich» (США); кумасси – «Sigma» (США); малат – «Sigma-Aldrich» (Германия); НАД·Н – «ICN Biomedicals Inc.» (США); НАДФ·Н – «Sigma» (США); нитротетразолий синий – «Sigma» (США); перколл – «Sigma-Aldrich» (США); ПВП-40 –

«Sigma» (США); краситель Понсо – «MP Biomedicals Inc.» (Франция); ротенон – «Sigma» (Германия); сукцинат – «Fluka» (Япония); Твин-20 – «GERBU» (Германия); Трис – «GERBU» (Германия); тритон X-100 – «Ferak Berlin» (Германия); цистеин – «ICN Biomedicals Inc.» (США); цитохром *c* – «ICN Biomedicals Inc.» (США); ЭДТА – «AppliChem» (Германия); H₂DCF-DA – «Fluka» (Нидерланды); KCN – «Sigma» (Германия); НАД⁺ – «Sigma-Aldrich» (США); MOPS – «AppliChem» (Германия). Остальные реактивы были отечественного производства квалификации ч.д.а., х.ч. и о.с.ч.

2.13. Статистическая обработка данных

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 (25%; 75% процентиль). Нормальность распределения проверялась с помощью критерия Шапиро-Уилки (ГОСТ-ИСО 5479-2002). В случае нормального распределения для доказательства наличия значимых различий между средними применяли однофакторный дисперсионный анализ с последующим множественным сравнением средних по методу Фишера [10], а в случае распределения, отличающегося от нормального, использовали Н-критерий Краскела-Уоллиса [42]. Парное сравнение средних значений при нормальном распределении, проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента, а при распределении, отличающимся от нормального, использовали критерий Вилкоксона-Манна-Уитни [10, 22]. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $p < 0,05$. В подписях к рисункам и таблицам *n* означает количество независимых экспериментов. Статистические расчеты осуществляли с помощью программного пакета SigmaPlot 12.5.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. ВЛИЯНИЕ ХОЛОДОВОГО ЗАКАЛИВАНИЯ НА ПАРАМЕТРЫ МОРОЗОУСТОЙЧИВОСТИ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКОВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

Для определения эффективности холодого закаливания этиолированных проростков озимой пшеницы анализировали влияние низкой положительной температуры 2 °С (в течение 7 суток) на рост побегов, содержание в тканях побегов воды, водорастворимых углеводов, дегидринов, и выживаемость проростков при действии отрицательных температур.

3.1.1. Рост и морозоустойчивость проростков

На рис. 9 представлен внешний вид 3-х суточных контрольных проростков озимой пшеницы. Перемещение этих проростков в условия длительного воздействия низкой положительной температуры, эффективной для закаливания озимых злаков (2 °С, 7 суток), сопровождалось почти полной остановкой ростовых процессов и характеризовалось снижением содержания воды в тканях побегов (рис. 10).



Рис. 9. Внешний вид этиолированных проростков озимой пшеницы в возрасте 3-х суток.

В качестве дополнительного контроля были использованы проростки, выращенные при 25 °С в темноте в течение 10 суток, соответствующие

возрасту закаленных проростков (рис. 10). Длина побегов 10-ти суточных проростков значительно превышала длину побегов проростков, закаленных при 2 °С в течение 7 суток, при этом степень ингибирования роста побегов составила 93,6% (рис. 10а). Содержание воды в тканях побегов при закаливании снижалось (рис. 10б).

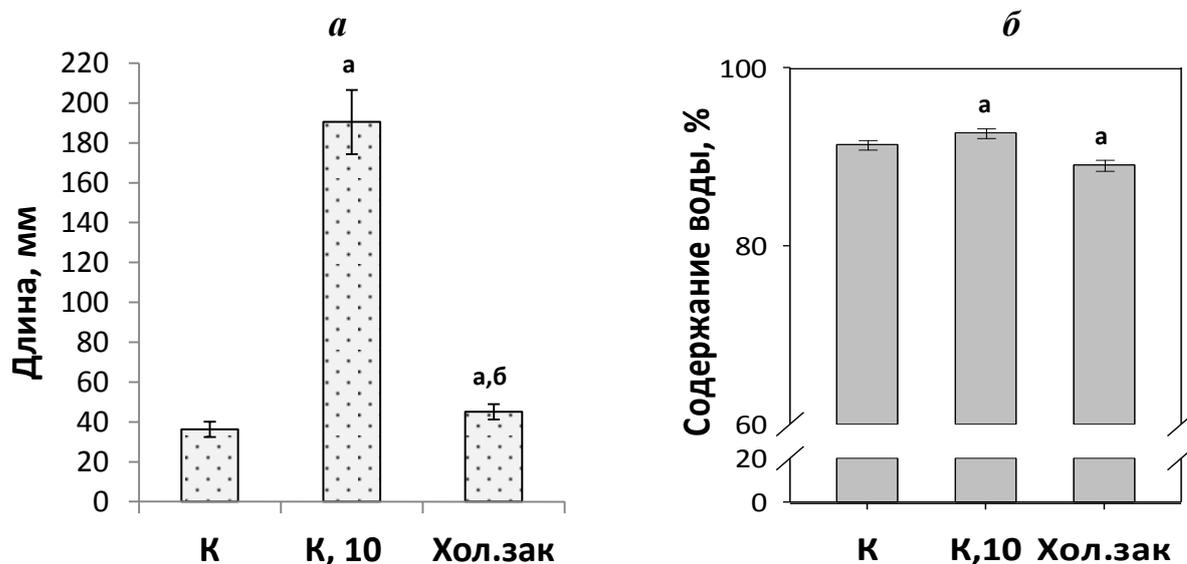


Рис. 10. Влияние холодового закаливания на рост побегов этиолированных проростков озимой пшеницы (а) и содержание в них воды (б).

Обозначения: К – контрольные проростки, выращенные при 25 °С в темноте в течение 3-х суток; К, 10 – контрольные проростки, выращенные в темноте при 25 °С в течение 10-ти суток; Хол.зак – 3-х суточные контрольные проростки, закаленные при 2 °С в течение 7 суток. $n=3-5$. $M \pm S.D.$ ^а – различия между вариантом К и исследуемым вариантом статистически значимы, ^б – различия между вариантом К,10 и исследуемым вариантом статистически значимы. Статистическую значимость различий определяли по критерию Фишера.

Наряду с изменениями ростовых процессов и содержания воды холодовое закаливание этиолированных проростков озимой пшеницы повышало их выживаемость при последующем действии отрицательной температуры. Как видно из рис. 11, контрольные проростки полностью погибали при –6 °С, в то время как закаленные проростки выдерживали температуры до –14 °С. В работе по определению морозостойчивости анализировали параметр LT_{50} , характеризующий температуру, при которой

погибает 50% растений. У контрольных проростков LT_{50} был равен $-3,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (95% ДИ от $-3,3$ до $-3,7\text{ }^{\circ}\text{C}$), в то время как у закаленных проростков он составил $-8,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (95% ДИ от $-8,0$ до $-8,9\text{ }^{\circ}\text{C}$).

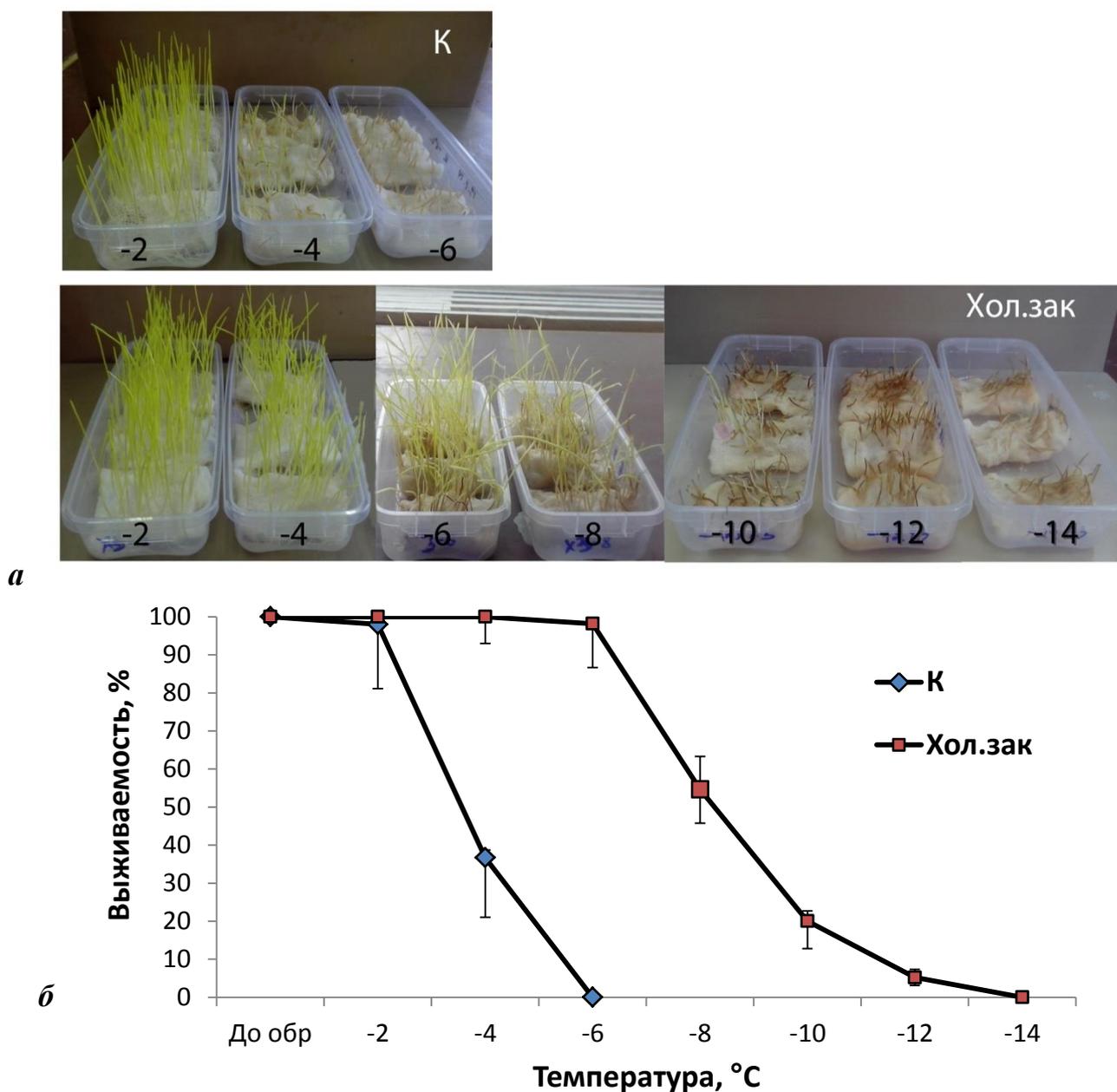


Рис. 11. Влияние холодого закаливания на морозоустойчивость этиолированных проростков озимой пшеницы.

a – внешний вид контрольных (К) и закаленных (Хол.зак) проростков после промораживания и последующего отрастания; *б* – выживаемость контрольных и закаленных проростков после промораживания.

Обозначения: До обр – до обработки температурой; К – контрольные проростки, выращенные при $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ в темноте в течение 3-х суток; Хол.зак – контрольные проростки, закаленные при $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 7 суток. $n=3$, в каждом независимом эксперименте анализировали не менее 150 проростков. $Me[25\%;75\%]$.

3.1.2. Содержание сахаров в побегах

Количественный анализ содержания общих водорастворимых углеводов выявил их высокое содержание в побегах 3-х суточных контрольных проростков (25,1% от воздушно-сухого веса) (рис. 12). Прохождение проростками холодого закаливания не приводило к достоверному изменению содержания в них сахаров, оно оставалось на таком же высоком уровне, как и в контрольных проростках (27,8%) (рис. 12).

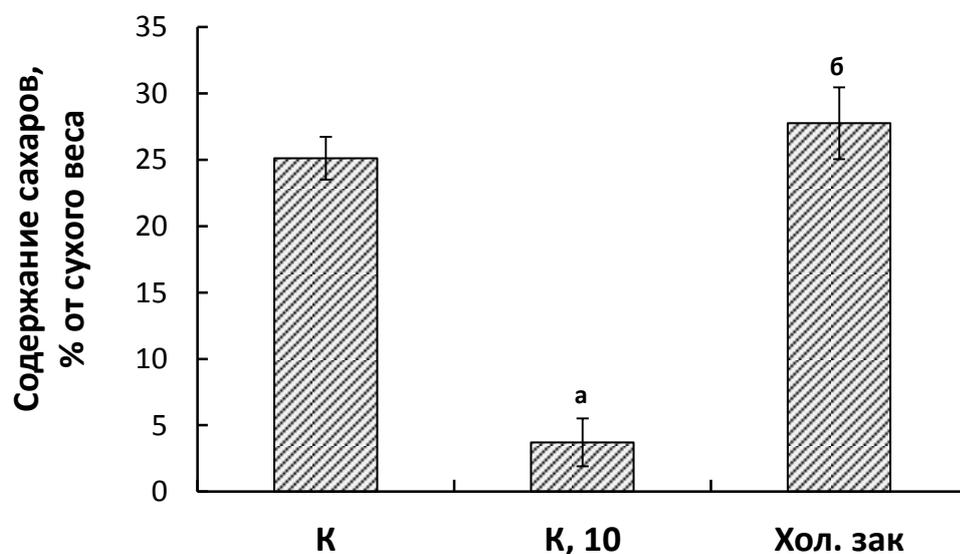


Рис. 12. Влияние холодого закаливания на содержание водорастворимых углеводов в побегах этиолированных проростков озимой пшеницы до и после холодого закаливания.

Обозначения: как на рис. 10. $n=3-5$. $M \pm S.D.$ ^а – различия между вариантом К и исследуемым вариантом статистически значимы, ^б – различия между вариантом К,10 и исследуемым вариантом статистически значимы. Статистическую значимость различий определяли по критерию Фишера.

В побегах 10-ти суточных проростков по сравнению с 3-х суточными контрольными проростками содержание водорастворимых углеводов снижалось в 6,8 раза и составило лишь 3,7% (рис. 12).

3.1.3. Синтез дегидринов в побегах

С использованием поликлональных антител против богатой лизином последовательности KIKKLPK, расположенной вблизи С-конца и входящей в состав К-сегмента, уникального для дегидринов, обнаружено, что действие

низкой положительной температуры индуцировало синтез дегидринов с мол. массами 209, 196, 66, 51, 46, 29, 24 и 17 кД в побегах этиолированных проростков озимой пшеницы (рис. 13). Содержание дегидринов зависело от длительности закаливания, было незначительным в 1-е сутки и увеличивалось к концу закаливания.

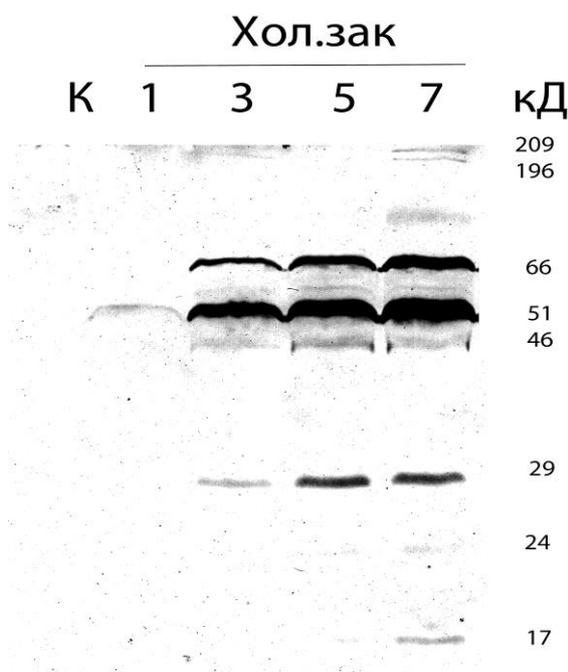


Рис. 13. Влияние холодового закаливания на синтез дегидринов в побегах этиолированных проростков озимой пшеницы.

Обозначения: К – контрольные проростки, выращенные при 25 °С в темноте в течение 3-х суток; Хол.зак – контрольные проростки, закаленные при 2 °С в течение 7 суток; кД – молекулярная масса белков. 1, 3, 5, 7 – сутки закаливания. $n=4$.

Таким образом, на основании данных по влиянию низкой температуры на рост проростков, содержание воды и водорастворимых углеводов, синтез дегидринов и результатов по выживаемости проростков после действия отрицательной температуры можно заключить, что действие низкой положительной температуры 2 °С в течение 7 суток было эффективным для повышения морозоустойчивости 3-х суточных этиолированных проростков озимой пшеницы. Контрольные и закаленные этиолированные проростки озимой пшеницы были использованы для выделения митохондрий и анализа их окислительной и фосфорилирующей активности, функционирования в митохондриях альтернативных НАД(Ф)-Н-дегидрогеназ и альтернативной оксидазы.

3.2. ВЛИЯНИЕ ХОЛОДОВОГО ЗАКАЛИВАНИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ИЗ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКОВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

Чтобы оценить функциональную активность изолированных митохондрий определяли интактность внешней мембраны митохондрий, окислительную активность митохондрий, степень сопряженности процессов окисления и фосфорилирования (коэффициент дыхательного контроля и отношение АДФ:О), вклад в дыхание альтернативных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ и альтернативной оксидазы, и содержание этих белков.

3.2.1. Окислительная и фосфорилирующая активность митохондрий

Для определения качества выделенных митохондрий анализировали интактность внешней мембраны по ее проницаемости для экзогенного цитохрома *c* [51] в отсутствие и в присутствии детергента Тритона X-100. Как оказалось, митохондрии, изолированные из побегов контрольных и закаленных проростков озимой пшеницы, характеризовались высокой интактностью внешней мембраны (рис. 14).

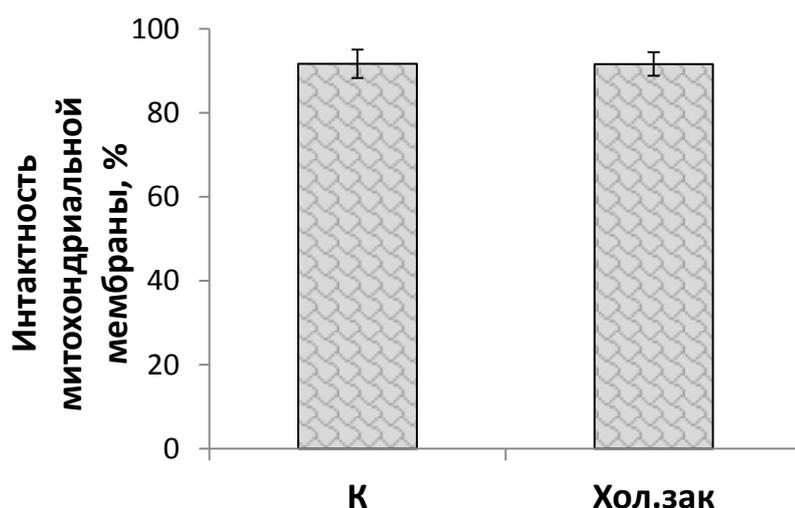


Рис. 14. Интактность внешней мембраны митохондрий из побегов контрольных и закаленных этиолированных проростков озимой пшеницы.

Обозначения: К – контрольные проростки, выращенные при 25 °С в темноте в течение 3-х суток; Хол.зак – контрольные проростки, закаленные при 2 °С в течение 7 суток. $n=3-5$. $M \pm S.D.$

Для определения окислительной активности изолированных митохондрий в качестве субстратов для дыхания использовали малат, малат в присутствии ротенона, сукцинат, НАД·Н и НАДФ·Н. Окисление малата в присутствии ротенона позволяет выявить функционирование «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа, а окисление экзогенного НАД·Н и НАДФ·Н в присутствии ротенона и Ca^{2+} – функционирование «внешних» НАД·Н-ДГ и НАДФ·Н-ДГ II типа, соответственно.

Митохондрии из этиолированных проростков окисляли используемые субстраты с различной интенсивностью (рис. 15).

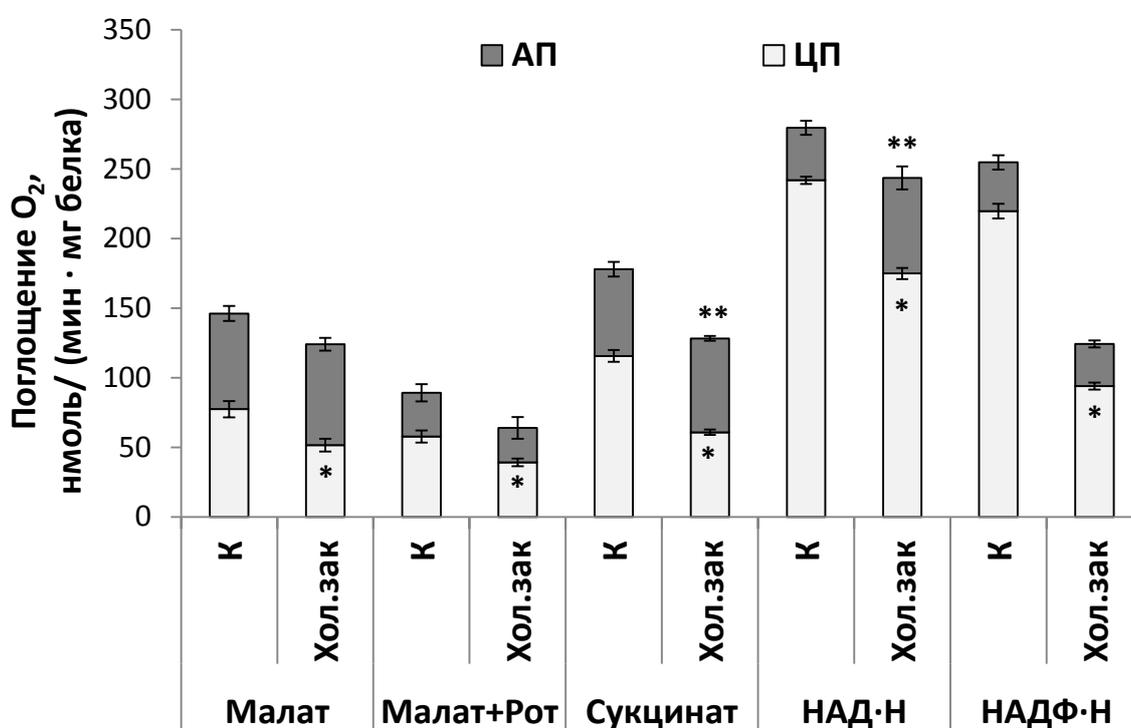


Рис. 15. Влияние холодового закаливания на дыхательную активность и вклад цитохромного (ЦП) и альтернативного (АП) путей в дыхание митохондрий этиолированных проростков озимой пшеницы.

Обозначения: К, Хол.зак – как на рис. 14. Малат – 10 мМ малат в присутствии 10 мМ глутамата; Малат+Рот – 10 мМ малат в присутствии 10 мМ глутамата и 3 мкМ ротенона; Сукцинат – 8 мМ сукцинат в присутствии 5 мМ глутамата и 3 мкМ ротенона; НАД·Н – 1 мМ НАД·Н в присутствии 3 мкМ ротенона и 0,06 мМ Ca^{2+} ; НАДФ·Н – 1 мМ НАДФ·Н в присутствии 3 мкМ ротенона и 0,06 мМ Ca^{2+} . На рис. вклад АП в дыхание представлен в виде потенциальной активности АО. $n=3$. $M \pm S.D.$ * – различия между вариантом К и вариантом Хол.зак статистически значимы (ЦП); ** – различия между вариантом К и вариантом Хол.зак статистически значимы (АП). Статистическую значимость различий определяли по t-критерию Стьюдента.

Проанализировав дыхательную активность митохондрий из

контрольных проростков, была отмечена высокая скорость окисления экзогенных НАД·Н и НАДФ·Н. Наименьшая скорость поглощения кислорода была характерна для митохондрий, окисляющих малат в присутствии ротенона. Наиболее высокие параметры сопряжения (величины коэффициента ДК – КДК и отношения АДФ:О) наблюдали в митохондриях контрольных растений при окислении малата. Величина КДК при окислении малата была равна 3,54, в то время как при окислении сукцината она равнялась 1,61, при окислении малата в присутствии ротенона – 2,51, при окислении НАД·Н и НАДФ·Н – 1,21 и 1,48, соответственно (табл. 1). Значение отношения АДФ:О при окислении малата и сукцината было близким к теоретически возможному (2,91 и 2,07, соответственно) (табл. 1).

Таблица 1

Величина коэффициента дыхательного контроля (КДК) и отношение АДФ:О в митохондриях из побегов этиолированных проростков озимой пшеницы, подвергнутых холодному закаливанию

Субстрат окисления	КДК		АДФ:О	
	К	Хол.зак	К	Хол.зак
Малат	3,54±0,16	3,72±0,29	2,91±0,16	2,76±0,08
Малат +Ротенон	2,51±0,41	3,03±0,04	2,16±0,04	2,27±0,09
Сукцинат	1,61±0,15	1,54±0,04	2,07±0,24	1,90± 0,34
НАД·Н	1,21±0,05	1,19±0,11	0,43±0,06	0,40±0,09
НАДФ·Н	1,48±0,15	1,16±0,02	0,57±0,05	0,42±0,03

Примечание: Обозначения как на рис. 14 и 15; n=3. М±S.D.

Известно несколько подходов для изучения активности альтернативной оксидазы: 1) определение реального вклада альтернативной оксидазы в дыхание (v_{alt}), который оценивают как часть дыхания, ингибируемого специфическими ингибиторами АО (наиболее часто гидроксамовыми

кислотами – БГК или СГК) в отсутствие ингибиторов ЦП; 2) определение потенциальной активности АО (V_{alt}), которую оценивают в присутствии ингибиторов ЦП (обычно цианида) и которая характеризует максимально возможный поток электронов через АО; 3) определение потенциальной активности АО в присутствии ее активаторов – ДТТ и пирувата ($V_{alt (ДТТ+Пир)}$); 4) определение вовлеченности терминальных оксидаз растений с помощью метода дискриминации или изотопного фракционирования кислорода [69, 70, 143, 184]. В настоящей работе для изучения активности АО в митохондриях, изолированных из проростков озимой пшеницы, применялись первые три подхода. В табл. 2 приведены данные по активности АО в митохондриях из контрольных и закаленных проростков озимой пшеницы, окисляющих малат в присутствии глутамата. Как показали результаты, реальный вклад АП в дыхание митохондрий, изолированных из контрольных проростков, измеряемый по скорости БГК-чувствительного окисления субстрата в отсутствие KCN, не превышал 11%, в то время как потенциальная активность АО была в 4,5 раза выше, а максимальная – в 6,0 раз выше по сравнению с v_{alt} (табл. 2).

Таблица 2

Поглощение кислорода и активность альтернативной оксидазы в митохондриях из контрольных и закаленных этиолированных проростков озимой пшеницы

Вариант обработки	10 мМ малат в присутствии 10 мМ глутамата			
	V_3	v_{alt}	V_{alt}	$V_{alt (ДТТ+Пир)}$
Контроль	146,22±5,72	10,42±0,73	47,05±5,44	62,96±4,09
Хол.зак	124,05±1,03*	28,49±5,75*	58,39±3,03*	61,94±5,11

Примечание: V_3 – скорость поглощения O_2 при фосфорилировании АДФ (нмоль O_2 /(мин · мг белка)); v_{alt} – реальный вклад АО в дыхание (дыхание ингибируемое БГК в отсутствие KCN); V_{alt} – потенциальная активность АО (дыхание ингибируемое БГК в присутствии KCN); $V_{alt (ДТТ+Пир)}$ – максимальная активность АО (дыхание ингибируемое БГК в присутствии KCN на фоне 1 мМ ДТТ и 5 мМ пирувата); v_{alt} , V_{alt} и $V_{alt (ДТТ+Пир)}$ * выражены в % от V_3 . Концентрация БГК составляла 1 мМ, KCN – 0,4 мМ. $n=3-6$. $M \pm S.D.$ – различия между вариантом К и вариантом Хол.зак статистически значимы по t-критерию Стьюдента.

Холодовое закаливание проростков озимой пшеницы приводило к повышению реального вклада АП и потенциальной активности АО в митохондриях (табл. 2). Сходные результаты были получены с использованием сукцината и НАД·Н (не показано).

Прохождение проростками холодого закаливания приводило к снижению скорости фосфорилирующего дыхания в изолированных из них митохондриях при окислении всех субстратов (рис. 15). Уменьшение скорости дыхания митохондриями после холодого закаливания проростков происходило за счет снижения транспорта электронов через ЦП (рис. 15). В этих же условиях отмечено перераспределение потока электронов между ЦП и АП: на фоне ингибирования ЦП увеличивался вклад АП в дыхание. Так, при окислении сукцината и НАД·Н в митохондриях наблюдали увеличение потенциальной активности АО на 8,0 и 82,2%, соответственно (рис. 15). Поскольку холодое закаливание увеличивало транспорт электронов по АП и сохранялась высокая скорость окисления экзогенного НАД·Н, то в дальнейшем была изучена активность альтернативных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ и альтернативной оксидазы, содержание белков АО, NDB и NDA в контрольных условиях и после закаливания.

3.2.2. Функционирование альтернативных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ и альтернативной оксидазы

Высокая скорость окисления экзогенных НАД·Н и НАДФ·Н в митохондриях из контрольных проростков озимой пшеницы указывает на высокую активность в этих условиях «внешних» НАД·Н и НАДФ·Н-ДГ. Активность же «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа, определяемая по скорости окисления малата в присутствии ротенона, в этих условиях ниже по сравнению с «внешними» (рис. 15). Потенциальная активность альтернативной оксидазы, как выяснилось, зависит от субстрата дыхания. Наибольший вклад АО в дыхание был отмечен при окислении митохондриями малата и сукцината, в то время как потенциальная

активность АО при функционировании «внешних» и «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа была низкой (рис. 15).

При холодном закаливании проростков отмечено значительное снижение скорости окисления митохондриями НАДФ·Н (в 2,1 раза) и малата в присутствии ротенона (в 1,4 раза) (рис. 15). Это указывает на снижение в этих условиях активности «внешней» НАДФ·Н-ДГ и «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа. В то же время скорость окисления НАД·Н митохондриями закаленных проростков остается на высоком уровне (рис. 15). В условиях холодного закаливания на фоне ингибирования ЦП увеличивался вклад в дыхание АП, связанного с функционированием АО. При окислении НАД·Н митохондриями вклад АП в дыхание увеличивался на 82,2% (рис. 15). Это свидетельствует о том, что функционирование «внешней» НАД·Н-ДГ II типа в митохондриях озимой пшеницы в условиях низких температур сопряжено с функционированием АО.

С использованием специфических антител в митохондриях из этиолированных проростков озимой пшеницы показано присутствие белков альтернативного пути транспорта электронов – «внутренних» (NDA) и «внешних» (NDB) НАД(Ф)·Н-ДГ II типа и альтернативной оксидазы (АО) (рис. 16) [25].

Антитела против NDA *Solanum tuberosum* детектировали в митохондриях озимой пшеницы два полипептида с мол. массами 63 и 56 кД, антитела против NDB *S. tuberosum* – один полипептид с мол. массой 64 кД, а антитела против АО *Sauromatum guttatum* – два полипептида с мол. массами 31 и 32 кД (рис. 16). Прохождение проростками холодного закаливания приводило к увеличению содержания в митохондриях АО и NDB, в то время как содержание NDA в них снижалось (рис. 16).

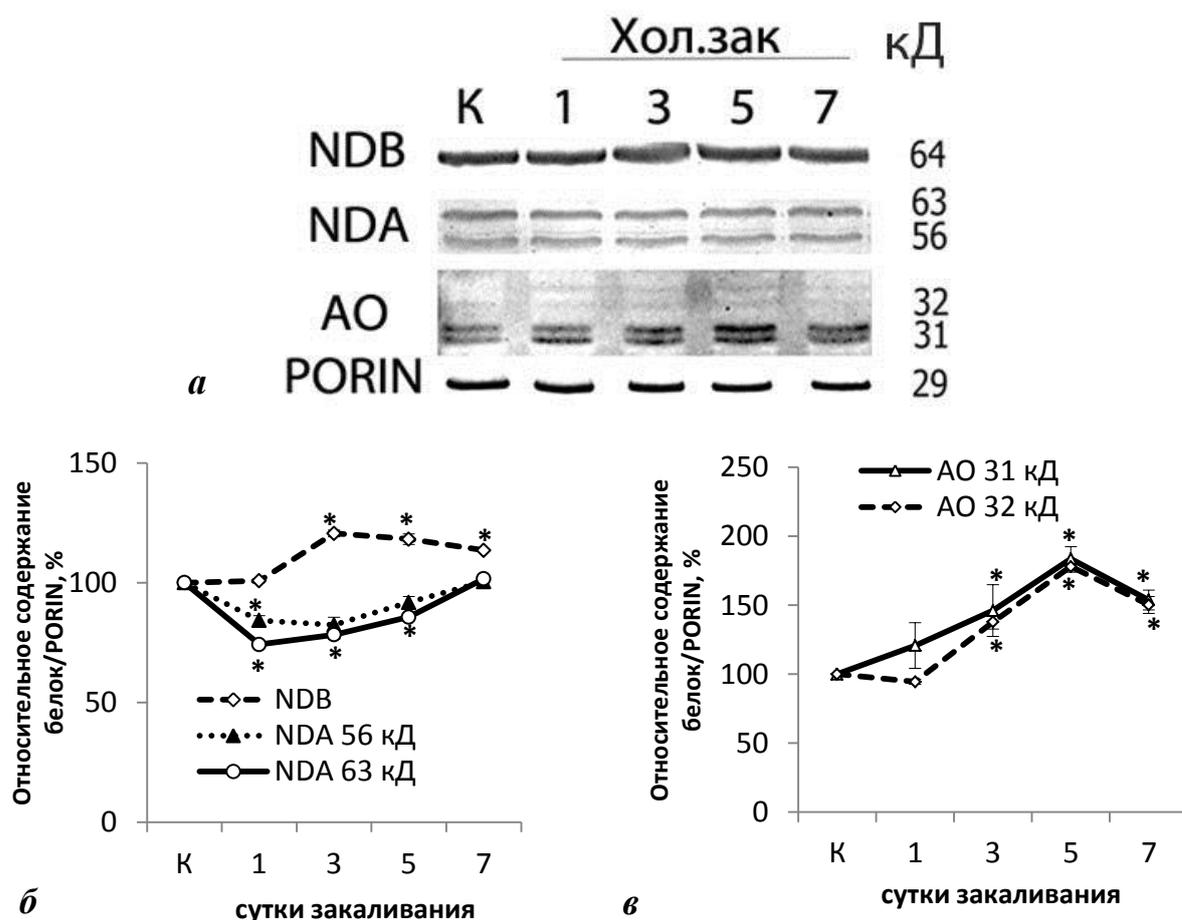


Рис. 16. Влияние холодого закаливания на содержание белков АО, «внутренних» (NDA) и «внешних» (NDB) НАД(Ф)·Н-ДГ II типа в митохондриях из этиолированных проростков озимой пшеницы.

а – Иммунофореграмма, **б** и **в** – относительное содержание исследуемых белков по отношению к порину.

Обозначения: К – контрольные проростки, выращенные при 25 °С в темноте в течение 3-х суток; Хол.зак – контрольные проростки, закаленные при 2 °С в течение 7 суток. 1, 3, 5, 7 – сутки закаливания; кД – молекулярные массы белков. $n=3$. $M \pm S.D.$ * – различия между вариантом К и сутками закаливания статистически значимы по t-критерию Стьюдента.

Таким образом, холодое закаливание проростков озимой пшеницы приводило к снижению дыхательной активности митохондрий, ингибированию ЦП, увеличению вклада АП и содержания в митохондриях АО. Так же при закаливании митохондрии сохраняли способность с высокой скоростью окислять экзогенный НАД·Н, что было сопряжено с увеличением вклада АО в дыхание. Учитывая возможную антиоксидантную функцию АО в растительных митохондриях, можно предположить, что при холодоем закаливании проростков альтернативная оксидаза снижает генерацию АФК.

3.2.3. Антиоксидантная роль альтернативной оксидазы

Поскольку митохондрии являются основным источником образования АФК в гетеротрофных тканях, то предстояло выяснить как холодовое закаливание влияет на содержание АФК в митохондриях этиолированных проростков, и может ли АО в этих условиях выполнять антиоксидантную функцию. Для этого изучали содержание АФК в митохондриях контрольных и закаленных проростков, а также в митохондриях из проростков, подвергнутых действию повреждающей отрицательной температуры. Антиоксидантную функцию АО изучали с помощью ингибиторного анализа. Для определения уровня АФК в митохондриях использовали флуоресцентный краситель $H_2DCF-DA$, который проникает внутрь клеток или органелл, с помощью эстераз превращается в H_2DCF и при реакции с АФК быстро окисляется во флуоресцентный DCF [29, 142, 202].

Судя по флуоресценции DCF, митохондрии из закаленных проростков озимой пшеницы имели более высокое содержание АФК, по сравнению с митохондриями контрольных проростков (рис. 17) [2]. Содержание АФК в митохондриях после закаливания в 1,5 раза превышало его содержание в контрольных проростках (рис. 17). Действие отрицательной температуры $-8^{\circ}C$ в течение 6 часов (Холодовой шок) на контрольные проростки озимой пшеницы приводило к значительному увеличению содержания АФК в изолированных из них митохондриях (рис. 17). Содержание АФК в митохондриях после холодового шока было в 11 раз выше по сравнению с их содержанием в митохондриях из проростков, не подвергнутых отрицательной температуре (рис. 17). В митохондриях закаленных проростков такого значительного образования АФК после холодового шока не происходило (рис. 17). Можно предположить, что в предотвращении развития окислительного стресса при холодовом шоке в закаленных проростках участвует АО, вклад которой в дыхание в этих условиях возрастает (рис. 15). Следует отметить, что выживаемость закаленных

проростков после холодового шока составляла 73%, в то время как контрольные проростки полностью погибали [8].

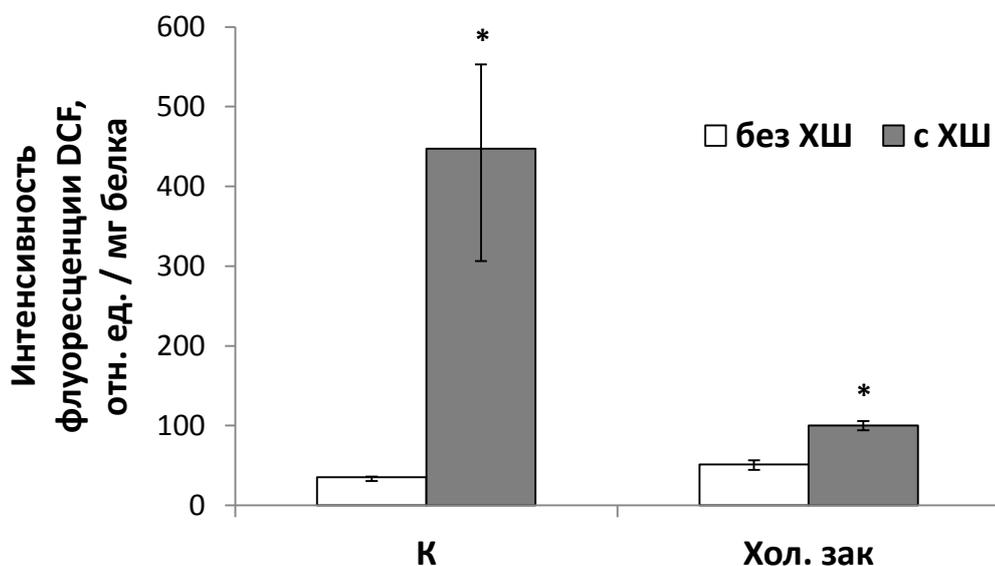


Рис. 17. Содержание АФК в митохондриях контрольных и закаленных проростков озимой пшеницы, подвергнутых холодовому шоку (ХШ).

Обозначения: как на рис. 14. $n=3-10$. Me[25%;75%]. * – различия между стрессированным и нестрессированным вариантом статистически значимы по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни.

Для оценки способности компонентов ЭТЦ митохондрий озимой пшеницы к генерации АФК и выявления антиоксидантной способности АО оценивали изменения уровня АФК в митохондриях в присутствии различных ингибиторов цитохромного и альтернативного путей транспорта электронов (рис. 18) [2]. В работе использовали ингибиторы комплекса I ЭТЦ – ротенон, комплекса III ЭТЦ – антимицин А, комплекса IV ЭТЦ – KCN и альтернативной оксидазы – БГК. Как контроли специфичности действия флуоресцентного красителя $H_2DCF-DA$ применяли аскорбиновую кислоту и пероксид водорода, а также митохондрии, подвергнутые тепловой денатурации (70 °С, 10 мин). В качестве отрицательного контроля использовали компоненты реакции без митохондрий. Известно, что один из ингибиторов АО – салицилгидроксамовая кислота (СГК), может проявлять эстеразо-подобную активность, и при взаимодействии с $H_2DCF-DA$ приводит к образованию DCF [112]. Несмотря на это, исследователи функций митохондрий и хлоропластов активно применяют СГК для изучения

генерации АФК [108, 114], а флуоресценцию, связанную с образованием DCF при взаимодействии $H_2DCF-DA$ с СГК, вычитают из общей флуоресценции [114]. Поскольку в данной работе при изучении вклада АО в дыхание использовали производное гидроксамовой кислоты – бензгидроксамовую кислоту (БГК), то необходимо было сравнить эффекты БГК и СГК при взаимодействии с $H_2DCF-DA$. Следует также отметить, что СГК и БГК имеют различную степень аффинности при связывании с пероксидазами (у БГК она гораздо меньше) [165] – потенциальными катализаторами реакции окисления H_2DCF до DCF [202]. В отсутствие митохондрий добавление БГК или СГК в реакционную среду приводило к флуоресценции DCF (рис. 18a). В случае с СГК, флуоресценция была очень высокой и близкой к значению флуоресценции для митохондрий, инкубируемых с $H_2DCF-DA$ в отсутствие добавок. Уровень флуоресценции DCF при добавлении БГК был не таким значительным, как с СГК, поэтому этот ингибитор был использован для определения АФК в дальнейших экспериментах, а фоновую флуоресценцию, характерную для БГК, вычитали из общей флуоресценции. Ротенон, антимицин А и KCN не приводили к значимой флуоресценции DCF (рис. 18a). Отсутствие флуоресценции DCF в митохондриях, подвергнутых тепловой денатурации, подтверждает тот факт, что детекция АФК в митохондриях при инкубации с $H_2DCF-DA$ обусловлена функционированием ферментных систем (рис. 18a). Инкубация митохондрий с аскорбиновой кислотой почти полностью снижала уровень флуоресценции DCF в митохондриях, а пероксид водорода, напротив, значительно ее увеличивал (рис. 18a). Результаты с аскорбиновой кислотой, экзогенным пероксидом водорода и митохондриями, подвергнутыми тепловой денатурации, являются контролем специфичности данного метода определения содержания АФК в митохондриях.

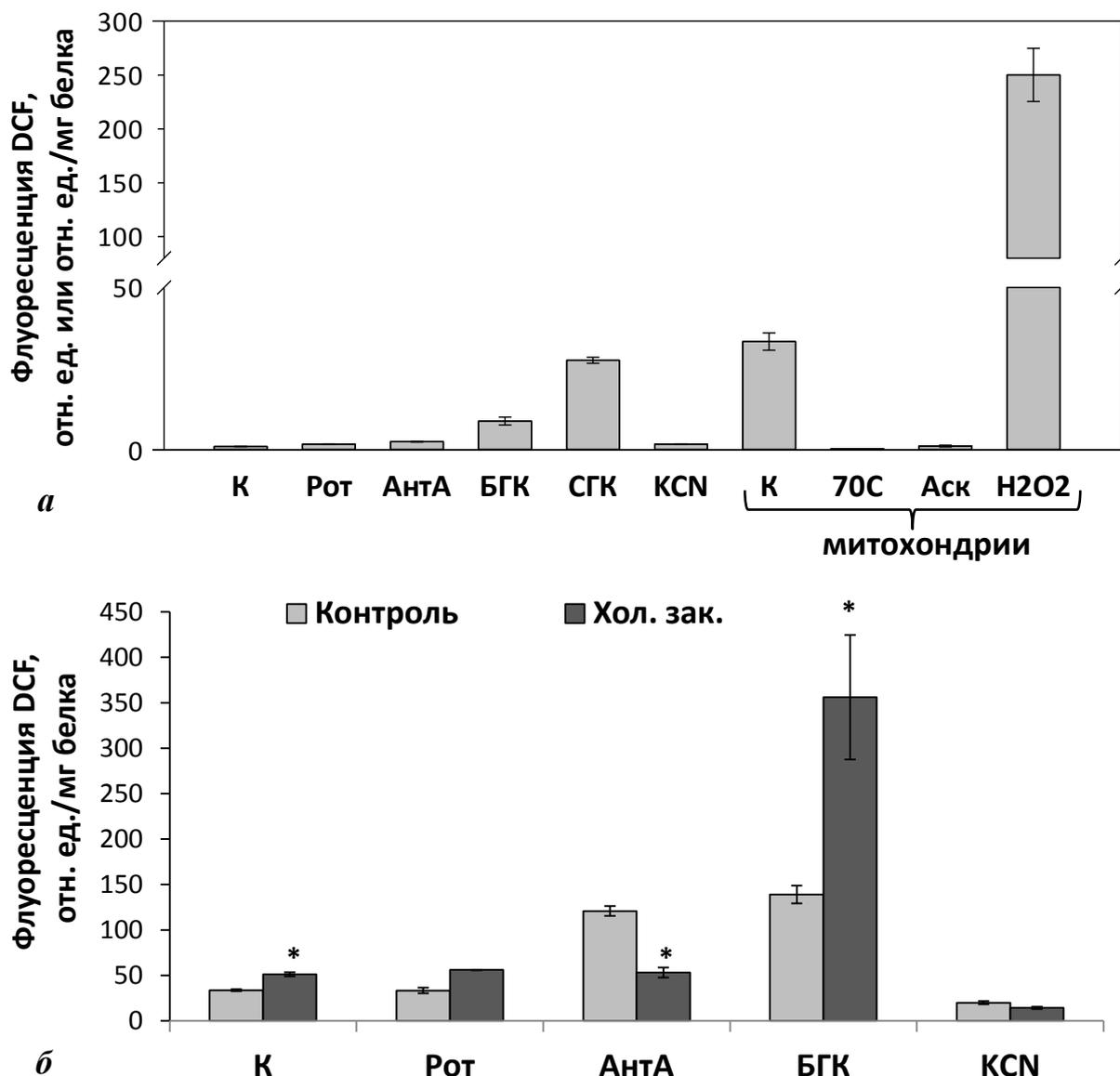


Рис. 18. Контроли специфичности действия 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата (H₂DCF-DA) (**а**) и влияние ингибиторов дыхательной цепи на образование АФК в митохондриях контрольных и закаленных проростков озимой пшеницы (**б**).

Обозначения: **Рис. а.** К – в отсутствие добавок; Рот – 3 мкМ ротенон; АнтА – 20 мкМ антимицин А; БГК – 1 мМ бензгидроксамовая кислота; СГК – 1 мМ салицилгидроксамовая кислота; KCN – 0,4 мМ цианид калия; 70С – тепловая денатурация при 70 °С (10 мин); Аск – 60 мМ аскорбиновая кислота; H₂O₂ – 1 мМ пероксид водорода; митохондрии – митохондрии из контрольных проростков озимой пшеницы. **Рис. б.** легенда – К – контрольные проростки, выращенные при 25 °С в темноте в течение 3-х суток; Хол.зак – контрольные проростки, закаленные при 2 °С в течение 7 суток; ось абсцисс – К – в отсутствие добавок; Рот – 3 мкМ ротенон; АнтА – 20 мкМ антимицин А; БГК – 1 мМ бензгидроксамовая кислота; KCN – 0,4 мМ цианид калия. n=3-8. M±S.D. * – различия между вариантом К и вариантом Хол.зак статистически значимы по t-критерию Стьюдента.

Инкубация митохондрий с антимицином А или БГК сопровождалась значительным усилением уровня АФК в митохондриях из контрольных проростков: в 3,6 и 4,2 раза, соответственно (по сравнению с митохондриями, инкубируемыми в отсутствие ингибиторов) (рис. 18б). В отличие от антимицина А, добавление ротенона не приводило к повышению генерации АФК, а инкубация с KCN снижала интенсивность их образования в митохондриях.

В отличие от митохондрий контрольных проростков, антимицин А не вызывал усиления образования АФК в митохондриях из закаленных проростков (рис. 18б). Инкубация митохондрий с БГК привела к повышению АФК в 6 раз, что превышает эффект данного ингибитора в контрольных митохондриях. Добавление KCN приводило к снижению содержания АФК на 73%. Учитывая данные по влиянию ингибиторов дыхательной цепи на уровень АФК в митохондриях закаленных проростков озимой пшеницы (большой эффект БГК в митохондриях закаленных проростков и неспособность антимицина А усиливать генерацию АФК в этих митохондриях) можно заключить, что активация АО приводит к предотвращению образования АФК в митохондриях при холодовом закаливании.

Поскольку выяснилось, что альтернативная оксидаза и ротенон-нечувствительные НАД(Ф)-Н-дегидрогеназы участвуют в механизмах повышения морозоустойчивости этиолированных проростков озимой пшеницы, а имеющиеся в литературе сведения свидетельствуют об их возможной защитной роли в фотосинтезирующих тканях при избыточном освещении, то на следующем этапе работы необходимо было провести сравнительный анализ функционирования этих белков в этиолированных и зеленых листьях озимой пшеницы при действии низких температур. Прежде всего, необходимо было оценить эффективность холодового закаливания этиолированных и зеленых растений на физиолого-биохимическом уровне.

3.3. ПАРАМЕТРЫ МОРОЗОУСТОЙЧИВОСТИ ЭТИОЛИРОВАННЫХ И ЗЕЛЕННЫХ РАСТЕНИЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ХОЛОДОВОМ ЗАКАЛИВАНИИ И ОБРАБОТКЕ САХАРОЗОЙ

Чтобы оценить эффективность холодого закаливания этиолированных и зеленых растений озимой пшеницы, анализировали ингибирование роста побегов, содержание воды, содержание водорастворимых углеводов и синтез дегидринов в листьях. Так же оценивали влияние холодого закаливания на выживаемость растений при последующем действии отрицательных температур. Поскольку в работе планировалось выявить связь между морозоустойчивостью растений, содержанием водорастворимых углеводов и активностью митохондриальных систем, связанных с несопряженным дыханием, этиолированные и зеленые растения обогащали сахарами. Для этого растения выращивали на растворе 12%-ой сахарозы в темноте в контрольных условиях или при низкой закалывающей температуре. Выбранная концентрация сахарозы является эффективной для повышения морозоустойчивости озимой пшеницы [44].

3.3.1. Параметры морозоустойчивости этиолированных растений озимой пшеницы

3.3.1.1. Рост и морозоустойчивость растений

На рис. 19 представлен внешний вид контрольных, контрольных после выращивания на сахарозе, закаленных в темноте и закаленных в темноте на сахарозе этиолированных растений озимой пшеницы.

Обработке сахарозой и низкой температурой подвергали растения в возрасте 7 суток. В качестве основного контроля использовали 7,5 суточные этиолированные растения, выращенные в темноте при 22 °С, которые соответствовали по ростовым показателям закаленным растениям (физиологическому возрасту закаленных растений) (рис. 19, 20) [7].

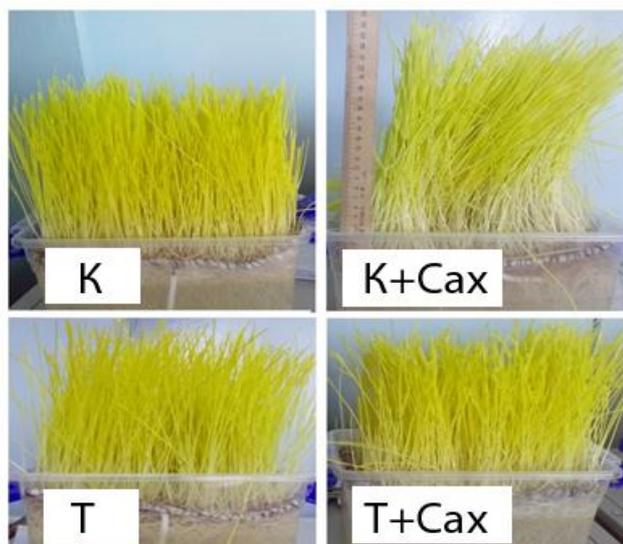


Рис. 19. Внешний вид контрольных и закаленных этиолированных растений озимой пшеницы.

Обозначения: К – контрольные растения, выращенные при 22 °С в темноте в течение 7,5 суток; К+Сах – 7-ми суточные контрольные растения, выращенные при 22 °С на растворе 12%-ой сахарозы в течение 7 суток; Т – 7-ми суточные контрольные растения, закаленные при 2 °С в темноте в течение 7 суток; Т+Сах – 7-ми суточные контрольные растения, закаленные в темноте на растворе 12%-ой сахарозы в течение 7 суток.

В качестве дополнительного контроля были использованы растения, выращенные при 22 °С в темноте в течение 14 суток, как контроль, соответствующий возрасту закаленных и выращенных на сахарозе растений (рис. 20).

Из рис. 20 видно, что закаленные растения соответствовали по длине побегов 7,5 суточным контрольным растениям, в то время как растения, выращенные в контрольных условиях на растворе сахарозы, превышали контрольные растения, выращенные в отсутствие сахарозы, на 29%.

Из полученных данных следует, что выращивание растений озимой пшеницы в темноте на растворе сахарозы в контрольных условиях приводит к ингибированию роста (на 59,6%). Закаливание растений при низкой температуре вызывало более выраженное ингибирование роста побегов, по сравнению с обработкой сахарозой. Ингибирование роста побегов у растений, закаленных на растворе сахарозы и в ее отсутствие, составляло 96,4 и 93,8%, соответственно (рис. 20).

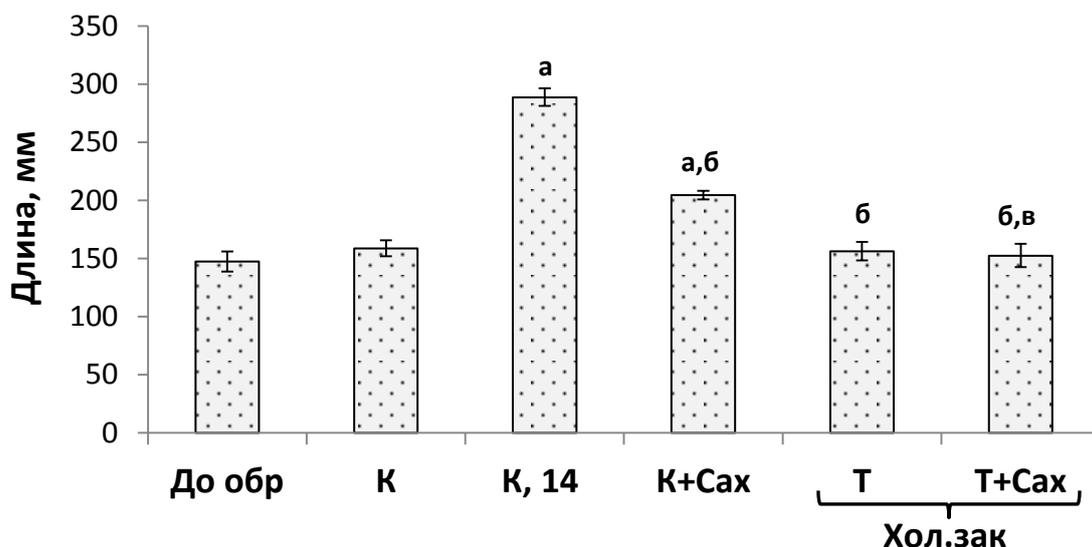


Рис. 20. Влияние экзогенной сахарозы и холодового закаливания на рост этиолированных растений озимой пшеницы.

Обозначения: До обр – контрольные растения, выращенные при 22 °С в темноте в течение 7 суток; К – контрольные растения, выращенные при 22 °С в темноте в течение 7,5 суток; К, 14 – контрольные растения, выращенные при 22 °С в темноте в течение 14 суток; К+Сах – 7-ми суточные контрольные растения, выращенные при 22 °С на растворе 12%-ой сахарозы в течение 7 суток; Т – 7-ми суточные контрольные растения, закаленные при 2 °С в темноте в течение 7 суток; Т+Сах – 7-ми суточные контрольные растения, закаленные в темноте на растворе 12%-ой сахарозы в течение 7 суток. Хол.зак – холодовое закаливание. $n=3-5$. $M \pm S.D.$ ^a – различия между вариантом К и исследуемым вариантом статистически значимы, ^б – различия между вариантом К,14 и исследуемым вариантом статистически значимы, ^в – различия между вариантом К+Сах и исследуемым вариантом статистически значимы. Статистическую значимость различий определяли по критерию Фишера.

Выращивание растений при низкой температуре и на растворе сахарозы сопровождалось снижением содержания воды в листьях растений (по сравнению с содержанием воды в контрольных 14-ти суточных растениях) (рис. 21).

Наряду с изменениями в скорости роста и содержании воды в листьях этиолированных растений при закаливании к холоду происходили изменения в морозоустойчивости растений. Выращивание растений на растворе сахарозы в контрольных условиях приводило к повышению морозоустойчивости растений на 3 °С, в то время как закаливание при 2 °С в темноте на растворе сахарозы и в ее отсутствие увеличивало морозоустойчивость растений на 8,5 °С и 6,8 °С, соответственно (рис. 22).

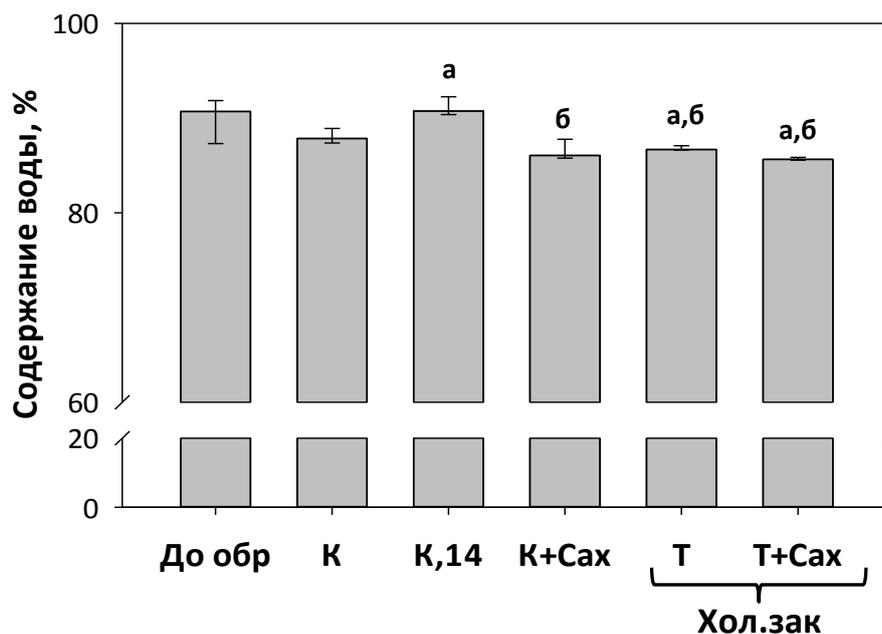


Рис. 21. Влияние экзогенной сахарозы и холодового закаливания на содержание воды в листьях этиолированных растений озимой пшеницы.

Обозначения: как на рис. 20. $n=3-8$. $Me[25\%;75\%]$. ^a – различия между вариантом К и исследуемым вариантом статистически значимы, ^б – различия между вариантом К,14 и исследуемым вариантом статистически значимы. Статистическую значимость различий оценивали по H-критерию Краскела-Уоллиса.

Как следует из данных, наибольшую морозоустойчивость этиолированные растения развивали при холодовом закаливании на растворе сахарозы. По сравнению с контрольными растениями, у которых LT_{50} составил $-3,5$ °C (95% ДИ от $-3,3$ до $-3,7$ °C), для растений, выращенных на сахарозе в контрольных условиях, $LT_{50} = -6,5$ °C (95% ДИ от $-5,1$ до $-7,7$ °C), для растений, закаленных без сахарозы, $LT_{50} = -10,3$ °C (95% ДИ от $-10,1$ до $-10,5$ °C), а для растений, закаленных на растворе сахарозы, он был равен -12 °C (95% ДИ от $-11,5$ до $-12,4$ °C) (рис. 22). Если сравнивать растения, закаленные на сахарозе, по сравнению с контрольными растениями, выращенными на сахарозе – видно, что морозоустойчивость при закаливании повышается на $5,5$ °C. Это свидетельствует о том, что для развития высокой морозоустойчивости растений озимой пшеницы одного обогащения сахарами недостаточно, требуется воздействие низкой положительной температуры.

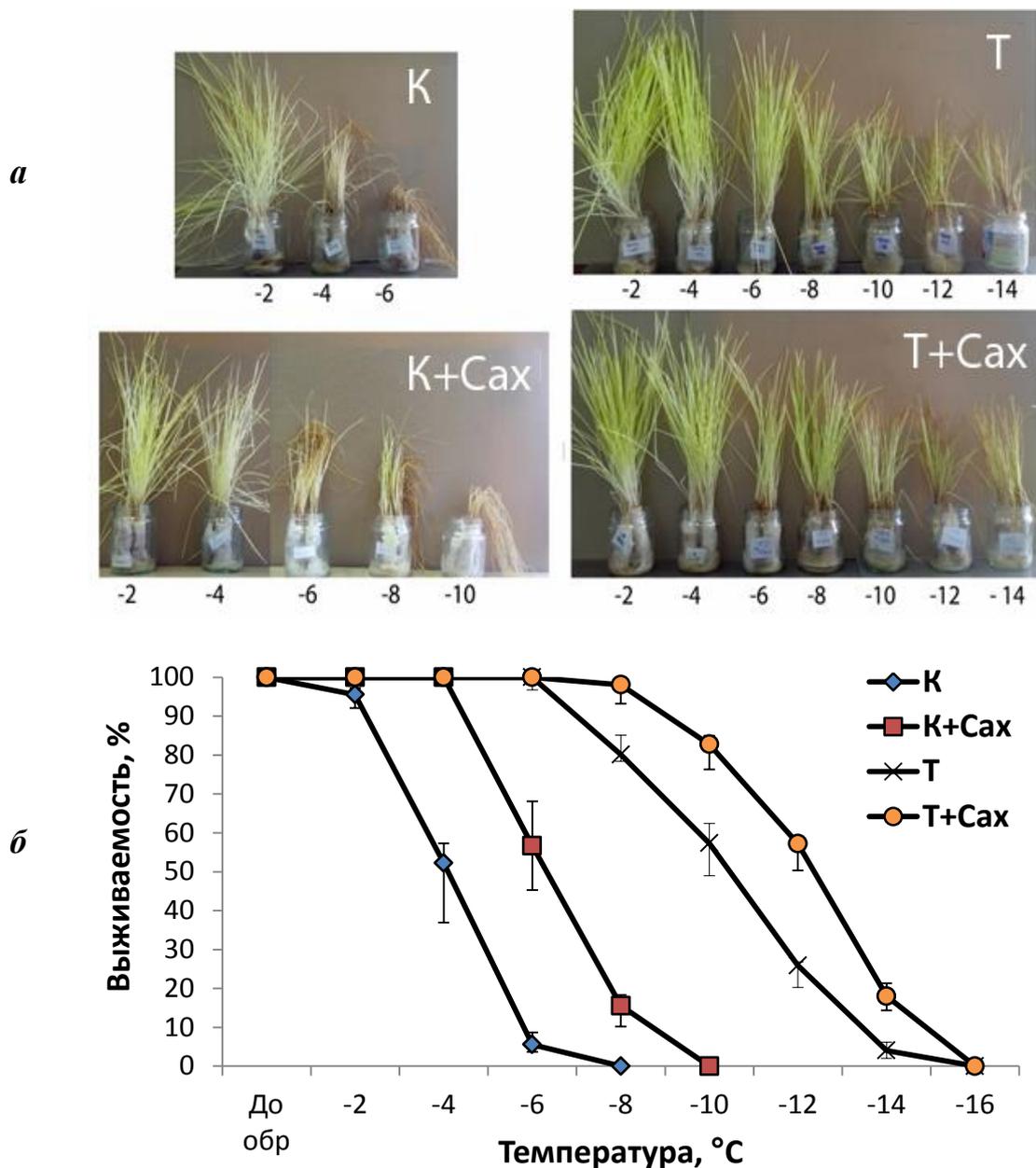


Рис. 22. Влияние экзогенной сахарозы и холодового закаливания на морозоустойчивость этиолированных растений озимой пшеницы.

a – внешний вид контрольных (К, К+Сах) и закаленных (Т, Т+Сах) растений после промораживания и последующего отрастания; *б* – выживаемость контрольных и закаленных проростков после промораживания.

Обозначения: До обр – до обработки температурой; К, К+Сах, Т, Т+Сах – как на рис. 19. $n=3-4$, в каждом независимом эксперименте анализировали не менее 150 растений. Me[25%;75%].

3.3.1.2. Содержание сахаров в листьях

Содержание сахаров в листьях этиолированных растений озимой пшеницы, выращиваемых в контрольных условиях, снижалось с возрастом. В 14-ти суточных растениях оно было в 3 раза меньше по сравнению с 7-ми суточными растениями (вариант «До обр») (рис. 23). Растения озимой

пшеницы активно поглощали сахарозу из раствора. При этом в листьях растений, выращенных при 22 °С на сахарозе, содержание сахаров было в 3 раза больше по сравнению с 7-ми суточными контрольными растениями и в 8,9 раза больше по сравнению с 14-ти суточными (рис. 23). Холодовое закаливание увеличивало содержание водорастворимых углеводов в листьях, это увеличение было больше у растений, закаленных на растворе сахарозы [7]. Если в закаленных растениях в отсутствие сахарозы содержание водорастворимых углеводов было в 1,7 раза больше по сравнению с 7-ми суточными растениями, то в закаленных на растворе сахарозы растениях оно увеличивалось в 3 раза (рис. 23).

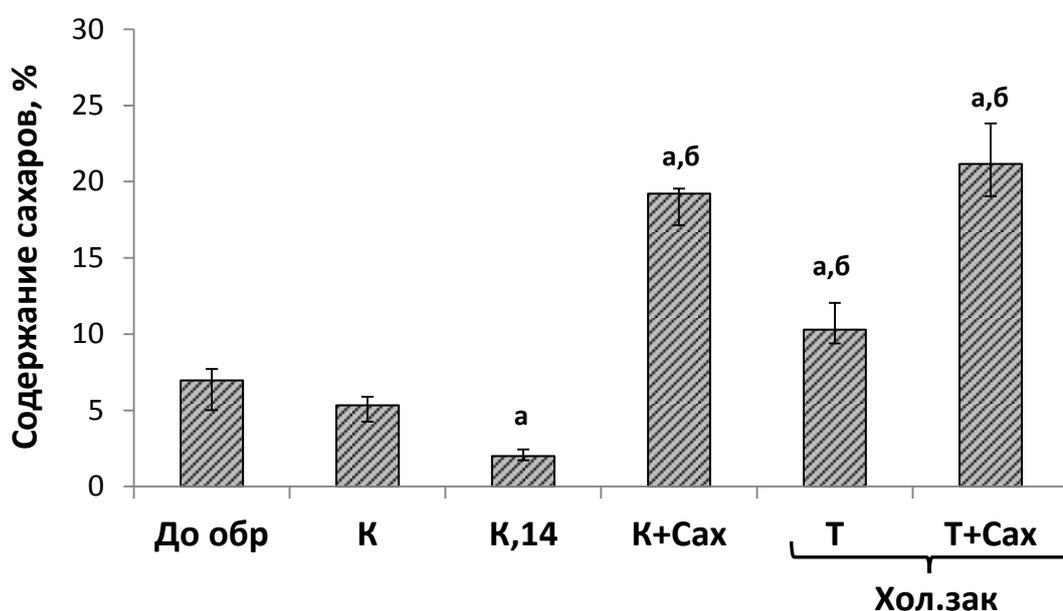


Рис. 23. Влияние экзогенной сахарозы и холодового закаливания на накопление водорастворимых углеводов в листьях этиолированных растений озимой пшеницы.

Обозначения: как на рис. 20. $n=3-8$. Me[25%;75%]. ^a – различия между вариантом К и исследуемым вариантом статистически значимы, ^b – различия между вариантом К,14 и исследуемым вариантом статистически значимы. Статистическую значимость различий оценивали по H-критерию Краскела-Уоллиса.

Из данных следует, что содержание водорастворимых углеводов в листьях растений, закаленных на растворе сахарозы при 2 °С, не отличалось от их содержания в листьях растений, выращенных на растворе сахарозы в контрольных условиях (22 °С).

3.3.1.3. Синтез дегидринов в листьях

С помощью иммуноблоттинга с антителами против дегидринов было проведено изучение влияния экзогенной сахарозы и низкой температуры на синтез дегидринов в листьях этиолированных растений озимой пшеницы. Как оказалось, экзогенная сахароза в контрольных условиях выращивания растений индуцирует синтез низкомолекулярных дегидринов с мол. массами 24 и 18 кД (рис. 24). Холодовое закаливание в отсутствие сахарозы индуцировало синтез дегидринов с мол. массами 209, 196, 66, 51, 46 и 24 кД (рис. 24). Наиболее высокое содержание было характерно для дегидринов с мол. массами 66 и 51 кД. При закаливании на растворе сахарозы происходил синтез дегидринов с мол. массами 209, 196, 66, 51, 46, 24 и 18 кД (рис. 24). Наиболее высокое содержание отмечали для полипептидов с мол. массами 66, 51, 46, 24 и 18 кД.

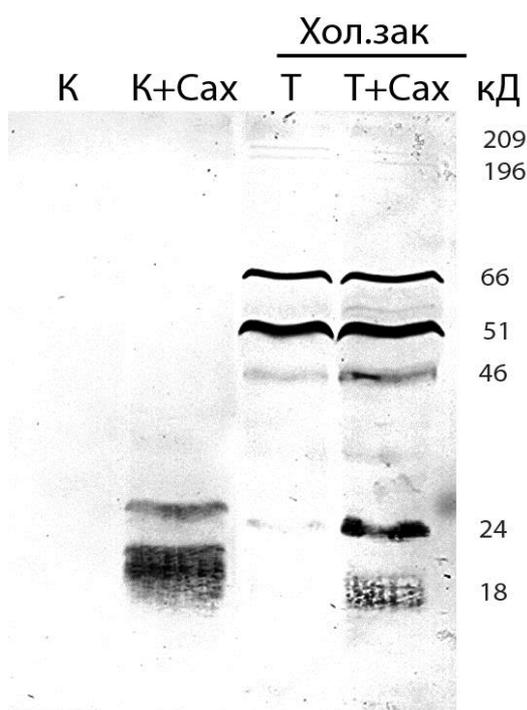


Рис. 24. Влияние экзогенной сахарозы и холодого закаливания на синтез дегидринов в листьях этиолированных растений озимой пшеницы.

Обозначения: Хол.зак – холодого закаливание; кД – молекулярные массы белков; К, К+Сах, Т; Т+Сах – как на рис. 19. $n=3$.

Содержание полипептида с мол. массой 24 кД в листьях закаленных на растворе сахарозы растений было выше по сравнению с содержанием в

листьях растений, закаленных в ее отсутствие. Синтез дегидринов с мол. массами 24 и 18 кД, вероятно, зависит от углеводного статуса клетки, так как увеличение их содержания наблюдалось как при выращивании растений на растворе сахарозы в контрольных условиях, так и при низкой температуре (рис. 24). Таким образом, выявлены дегидрины, синтез которых, вероятно, индуцируется углеводами.

3.3.2. Параметры морозоустойчивости зеленых растений озимой пшеницы

3.3.2.1. Рост и морозоустойчивость растений

На рис. 25 представлен внешний вид контрольных растений и растений, подвергнутых обработке сахарозой и действию низких температур. Зеленые растения для обработки сахарозой и низкой температурой использовали в возрасте 7 суток. В качестве основного контроля использовали 9-ти суточные зеленые растения, выращенные при 23/20 °С (16 ч фотопериод), они соответствовали по ростовым показателям закаленным растениям (физиологическому возрасту закаленных растений) (рис. 25, 26) [4, 34].

В качестве дополнительных контролей были использованы растения, соответствующие возрасту закаленных растений и растений, выращенных на сахарозе: а) растения, выращенные при 23/20 °С (16 ч фотопериод) в течение 14 суток (контроль для закаленных при световых режимах растений) и б) 14-ти суточные растения, выращенные при 23/20 °С (16 ч фотопериод) в течение 7 суток и при 22 °С в темноте в течение последующих 7 суток (контроль для растений, выращенных на растворе сахарозы при 22 °С и для растений, закаленных в темноте на растворе сахарозы или в ее отсутствие).

Следует отметить, что для растений, выращенных в темноте на сахарозе при 22 °С (К+Сах), характерно пожелтение листьев (рис. 25). Такое пожелтение листьев было связано с перемещением зеленых растений в темноту, поскольку при выращивании зеленых растений в темноте при 22 °С

на растворе Кнопа наблюдали сходную картину. Отсутствие подобного эффекта при закаливании растений в темноте на сахарозе при 2 °С (Т+Сах) или в ее отсутствие (Т) свидетельствует об отсутствии разрушения хлорофилла в условиях длительного пребывания растений в темноте при низкой закаливающей температуре.

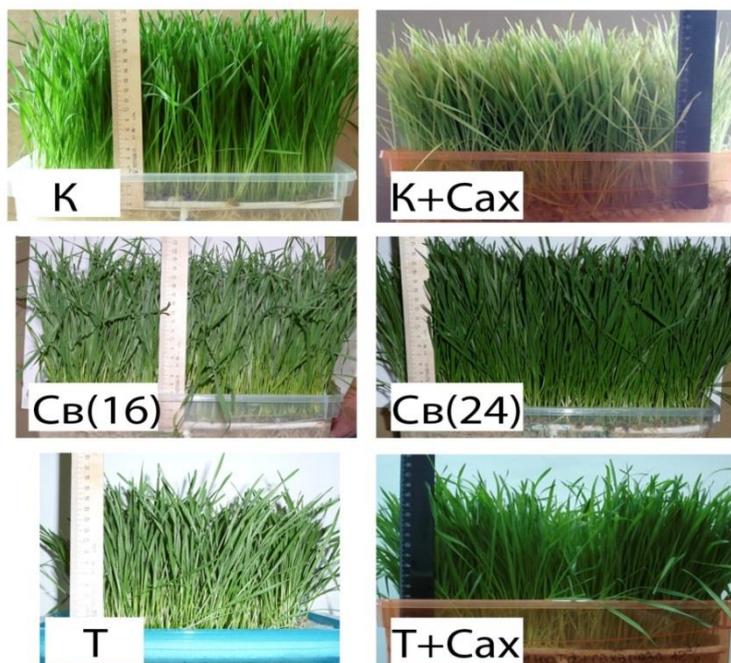


Рис. 25. Внешний вид контрольных и закаленных зеленых растений озимой пшеницы.

Обозначения: К – контрольные растения, выращенные при 23/20 °С (16 ч фотопериод) в течение 9 суток; К+Сах – 7-ми суточные контрольные растения, выращенные при 22 °С на растворе 12%-ой сахарозы в течение 7 суток; Св(16) – 7-ми суточные контрольные растения, закаленные при 5/2 °С (16 ч фотопериод) в течение 7 суток; Св(24) – 7-ми суточные контрольные растения, закаленные при 5 °С (24 ч фотопериод) в течение 7 суток; Т – 7-ми суточные контрольные растения, закаленные при 2 °С в темноте в течение 7 суток; Т+Сах – 7-ми суточные контрольные растения, закаленные при 2 °С в темноте на растворе 12%-ой сахарозы в течение 7 суток.

Низкая температура и экзогенная сахароза значительно ингибировали рост зеленых растений. Выращивание зеленых растений на растворе сахарозы при 22 °С приводило к ингибированию роста побегов на 76,4%, холодовое закаливание в темноте на растворе сахарозы и в ее отсутствие ингибировало рост побегов на 87,7 и 83,5 %, соответственно, по сравнению с 14-ти суточными контрольными растениями (рис. 26). Закаливание зеленых растений при 16 и 24 ч фотопериодах по сравнению с 14-ти суточными

контрольными растениями, ингибировало рост на 86,3 и 82,5%, соответственно. Длина закаленных растений и растений, выращенных на растворе сахарозы при 22 °С, не отличалась от длины растений основного контроля (9-ти суточных растений) (рис. 26).

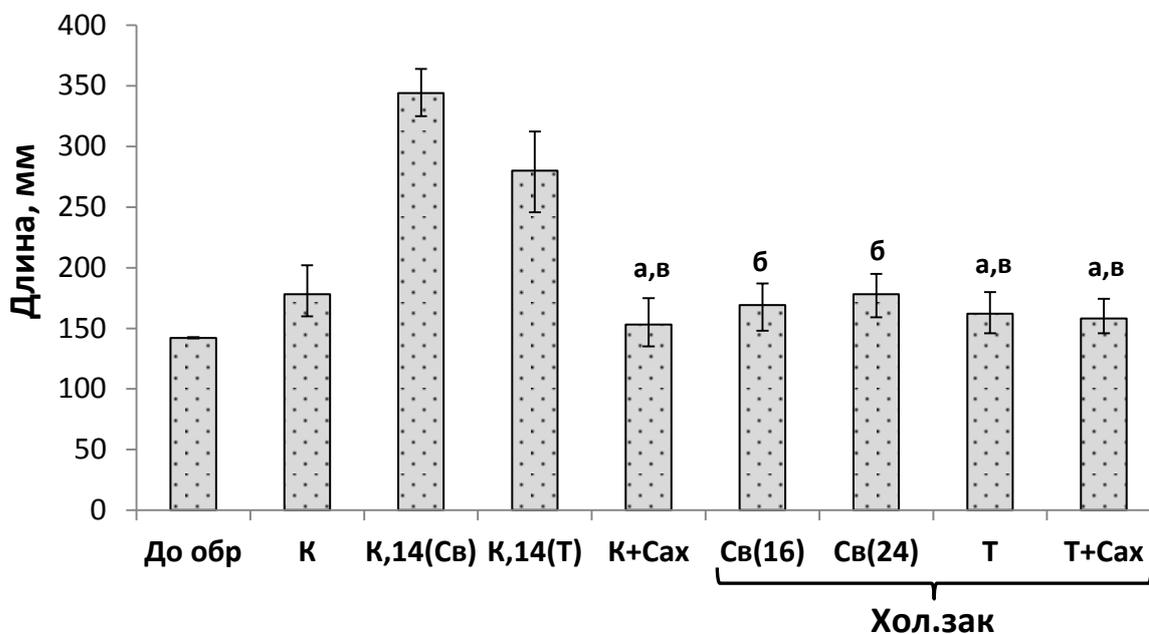


Рис. 26. Влияние экзогенной сахарозы и холодового закаливания на рост зеленых растений озимой пшеницы.

Обозначения: До обр – контрольные растения, выращенные при 23/20 °С (16 ч фотопериод) в течение 7 суток; К – контрольные растения, выращенные при 23/20 °С (16 ч фотопериод) в течение 9 суток; К,14(Св) – контрольные растения, выращенные при 23/20 °С (16 ч фотопериод) в течение 14 суток; К,14(Т) – 7-ми суточные контрольные растения, выращенные в темноте при 22 °С в течение 7 суток; К+Сах – 7-ми суточные контрольные растения, выращенные при 22 °С на растворе 12%-ой сахарозы в течение 7 суток; Св(16) – 7-ми суточные контрольные растения, закаленные при 5/2 °С (16 ч фотопериод) в течение 7 суток; Св(24) – 7-ми суточные контрольные растения, закаленные при 5 °С (24 ч фотопериод) в течение 7 суток; Т – 7-ми суточные контрольные растения, закаленные при 2 °С в темноте в течение 7 суток; Т+Сах – 7-ми суточные контрольные растения, закаленные в темноте на растворе 12%-ой сахарозы в течение 7 суток. Хол.зак – холодное закаливание. $n=3-6$. Me[25%;75%]. ^a – различия между вариантом К и исследуемым вариантом статистически значимы, ^б – различия между вариантом К,14(Св) и исследуемым вариантом статистически значимы, ^в – различия между вариантом К,14(Т) и исследуемым вариантом статистически значимы. Статистическую значимость различий оценивали по H-критерию Краскела-Уоллиса.

Наряду с ингибированием роста, низкая температура и экзогенная сахароза вызывали снижения содержания воды в листьях зеленых растений (рис.27).

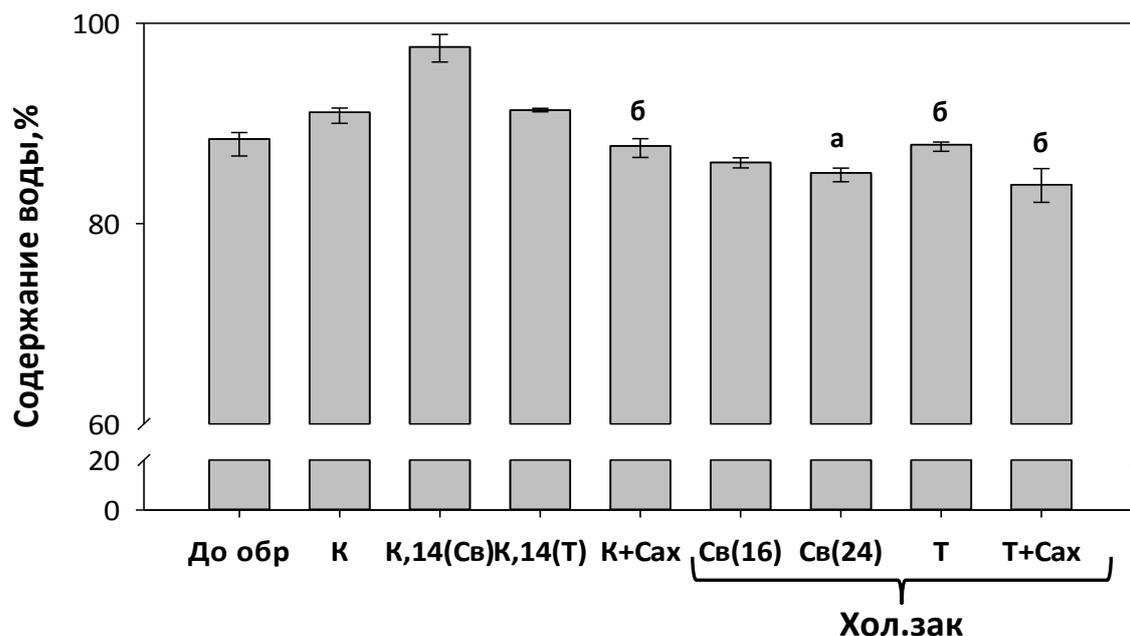


Рис. 27. Влияние экзогенной сахарозы и холодового закаливания на содержание воды в зеленых листьях озимой пшеницы.

Обозначения: как на рис. 26. $n=3-8$. $Me[25\%;75\%]$. ^a – различия между вариантом К,14(Св) и исследуемым вариантом статистически значимы, ^б – различия между вариантом К,14(Т) и исследуемым вариантом статистически значимы. Статистическую значимость различий оценивали по Н-критерию Краскела-Уоллиса.

Ингибирование роста и снижение содержания воды в листьях зеленых растений при выращивании на растворе сахарозы и при действии низкой температуры сопровождались повышением морозоустойчивости растений (рис. 28).

Наибольшую морозоустойчивость развивали растения, закаленные при 24 ч фотопериоде и в темноте на растворе сахарозы, LT_{50} у этих растений был равен $-13,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ (95% ДИ от -13 до $-14,1\text{ }^{\circ}\text{C}$) и $-15,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (95% ДИ от $-14,6$ до $-15,9\text{ }^{\circ}\text{C}$), соответственно. В то же время LT_{50} для растений, закаленных при 16 ч фотопериоде составил $-11,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (95% ДИ от $-10,5$ до $-12,4\text{ }^{\circ}\text{C}$), закаленных в темноте $-10,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (95% ДИ от $-9,6$ до $-10,6\text{ }^{\circ}\text{C}$), а для контрольных растений всего $-2,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (95% ДИ от $-2,0$ до $-2,3\text{ }^{\circ}\text{C}$). LT_{50} для растений, выращенных на растворе сахарозы в контрольных условиях составил $-4,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (95% ДИ от $-2,7$ до $-5,9\text{ }^{\circ}\text{C}$). Из данных следует, что у растений, закаленных на сахарозе, по сравнению с растениями,

выращенными на сахарозе в контрольных условиях, морозоустойчивость выше на 11 °С (рис. 28).

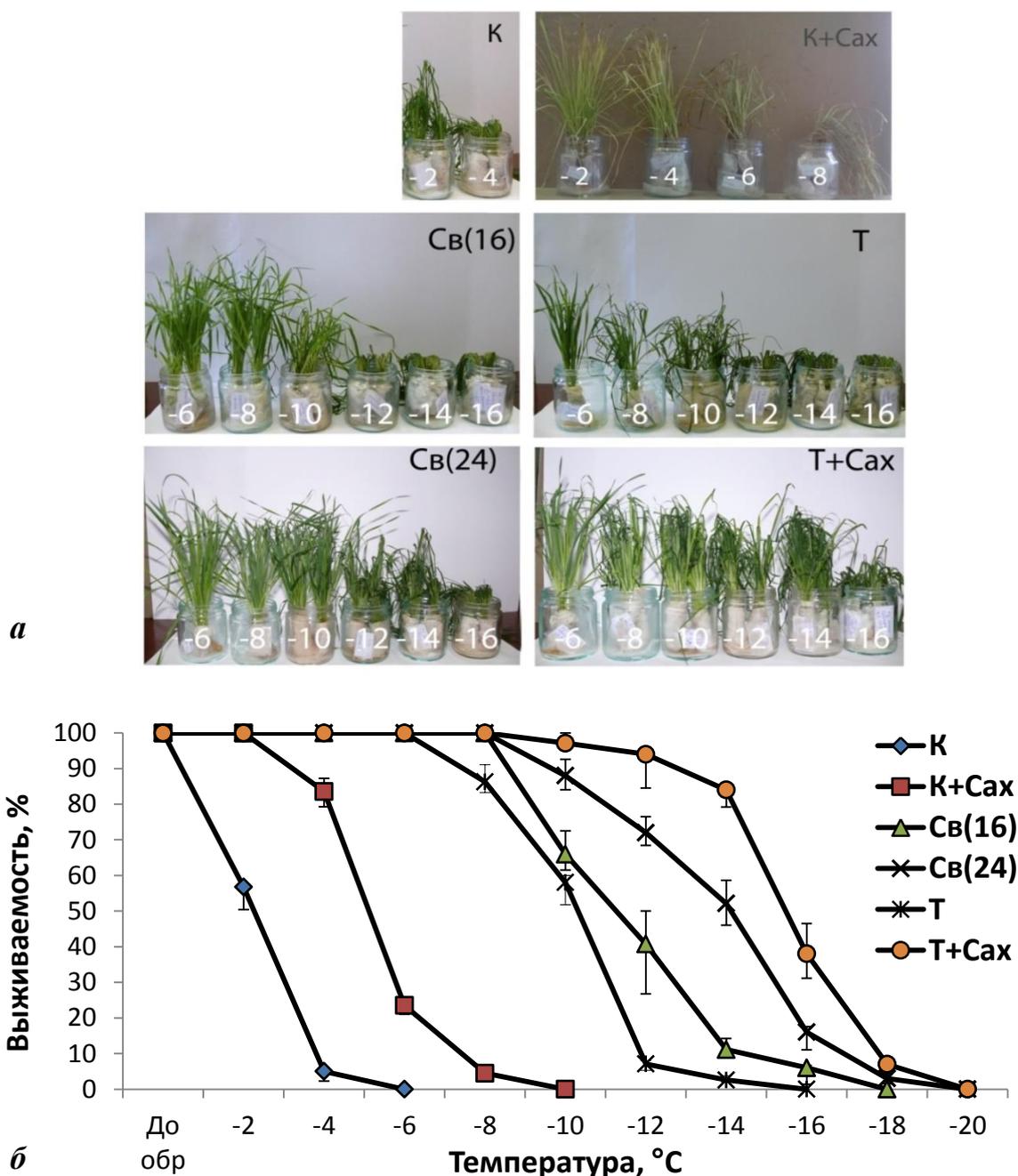


Рис. 28. Влияние экзогенной сахарозы и холодового закаливания на морозоустойчивость зеленых растений озимой пшеницы.

а – внешний вид контрольных (К, К+Сах) и закаленных (Св(16), Св(24), Т, Т+Сах) растений после промораживания; *б* – выживаемость контрольных и закаленных проростков при промораживании.

Обозначения: До обр – до обработки температурой; К, К+Сах, Св(16), Св(24), Т, Т+Сах – как на рис. 25. $n=3-4$, в каждом независимом эксперименте анализировали не менее 150 проростков. Ме[25%;75%].

Так же как и в случае этилированных растений можно сделать вывод о

том, что для развития высокой морозоустойчивости растений озимой пшеницы одного обогащения сахарами недостаточно, требуется воздействие низкой положительной температуры. Однако обогащение сахарами при закаливании обеспечивает дополнительный прирост морозоустойчивости.

3.3.2.2. Содержание сахаров в листьях

Выращивание зеленых растений в темноте на растворе сахарозы при 22 °С и холодное закаливание на свету (16 ч и 24 ч фотопериоды) и в темноте (на растворе сахарозы и в ее отсутствии) влияло на содержание водорастворимых углеводов в листьях (рис. 29).

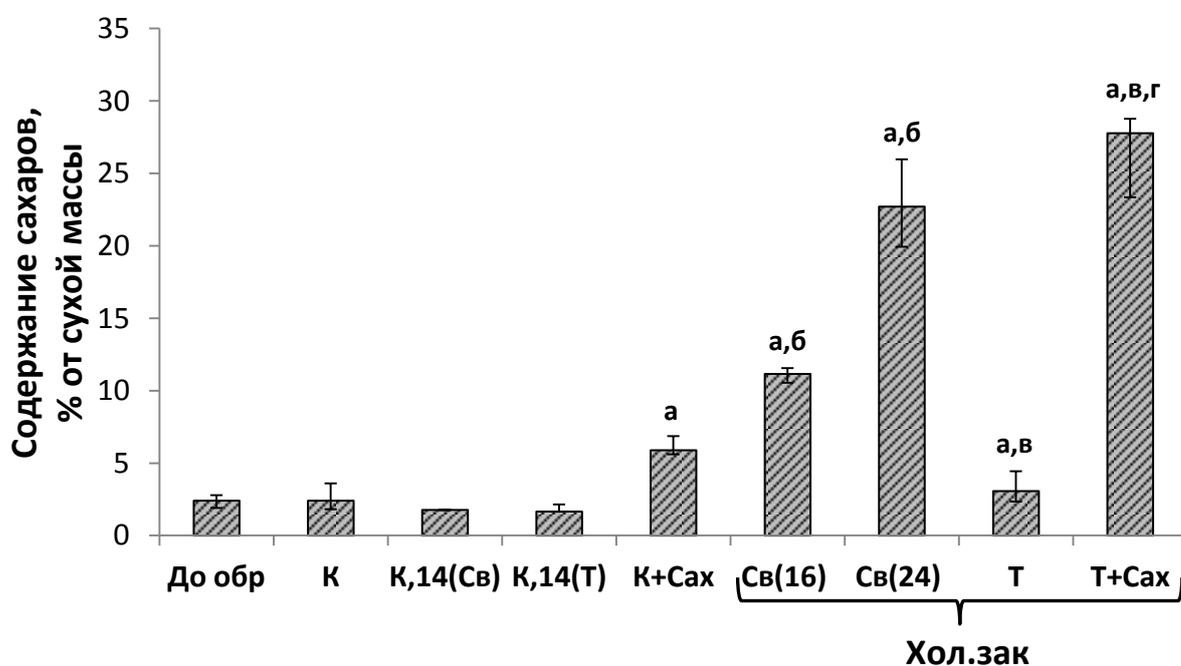


Рис. 29. Влияние экзогенной сахарозы и холодного закаливания на содержание водорастворимых углеводов в зеленых листьях озимой пшеницы.

Обозначения: как на рис. 26. $n=3-6$. Me[25%;75%]. ^a – различия между вариантом К и вариантом обработки статистически значимы, ^б – различия между вариантом К,14(Св) и исследуемым вариантом статистически значимы, ^в – различия между вариантом К,14(Т) и исследуемым вариантом статистически значимы, ^г – различия между вариантом К+Сах и исследуемым вариантом статистически значимы. Значимость различий оценивали по Н-критерию Краскела-Уоллиса.

Выращивание растений на сахарозе в контрольных условиях приводило к поглощению сахаров из раствора и увеличению их содержания в листьях по сравнению с контролем в 2,3 раза. Холодное закаливание по-разному влияло на накопление водорастворимых углеводов в листьях озимой

пшеницы (рис. 29) [4, 34].

Наибольшее содержание сахаров в зеленых листьях наблюдалось при закаливании растений при 24 ч фотопериоде и в темноте на растворе сахарозы (рис. 29). Закаливание в этих условиях приводило к увеличению в листьях содержания сахаров в 8,8 и 10,5 раз, соответственно. При закаливании в условиях 16 ч фотопериода содержание сахаров в листьях увеличивалось в 4,4 раза, а при закаливании в темноте увеличивалось в 1,3 раза (рис. 29). Содержание водорастворимых углеводов в листьях растений, закаленных на сахарозе, по сравнению с растениями, выращенными при 22 °С на сахарозе, было больше в 4,5 раза (рис. 29).

3.3.2.3. Синтез дегидринов в листьях

Холододовое закаливание зеленых растений озимой пшеницы независимо от условий освещенности сопровождалось синтезом в листьях дегидринов с мол. массами около 209, 196, 66, 51, 46, 24, 18 и 16,5 кД (рис. 30).

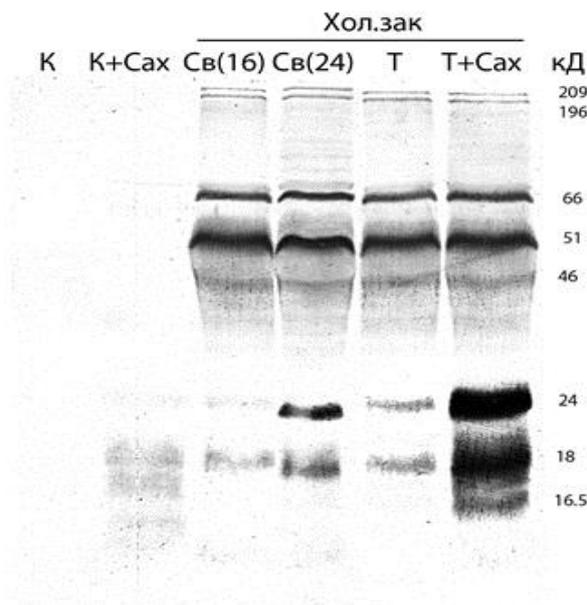


Рис. 30. Влияние экзогенной сахарозы и холододового закаливания на синтез дегидринов в зеленых листьях озимой пшеницы.

Обозначения: Хол.зак – холододовое закаливание; кД – молекулярные массы белков; К, К+Сах, Св(16), Св(24), Т, Т+Сах – как на рис. 25. $n=3$.

Содержание полипептидов с мол. массой 24, 18 и 16,5 кД было выше у растений, закаленных на растворе сахарозы. Синтез дегидрина с мол. массой 18 кД наблюдали в зеленых листьях и при выращивании на растворе

сахарозы в контрольных условиях (рис. 30). Данные по синтезу дегидринов с мол.массами 24 и 18 кД в зеленых листьях совпадают с данными синтеза этих дегидринов в этиолированных листьях (рис. 24, 30).

3.4. ВЛИЯНИЕ ХОЛОДОВОГО ЗАКАЛИВАНИЯ И ЭКЗОГЕННОЙ САХАРОЗЫ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ИЗ ЛИСТЬЕВ ЭТИОЛИРОВАННЫХ И ЗЕЛЕННЫХ РАСТЕНИЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

3.4.1. Митохондрии из листьев этиолированных растений

3.4.1.1. Окислительная и фосфорилирующая активность митохондрий

Очищенные из этиолированных листьев митохондрии характеризовались высокой степенью интактности внешней митохондриальной мембраны (86-88%) (рис. 31).

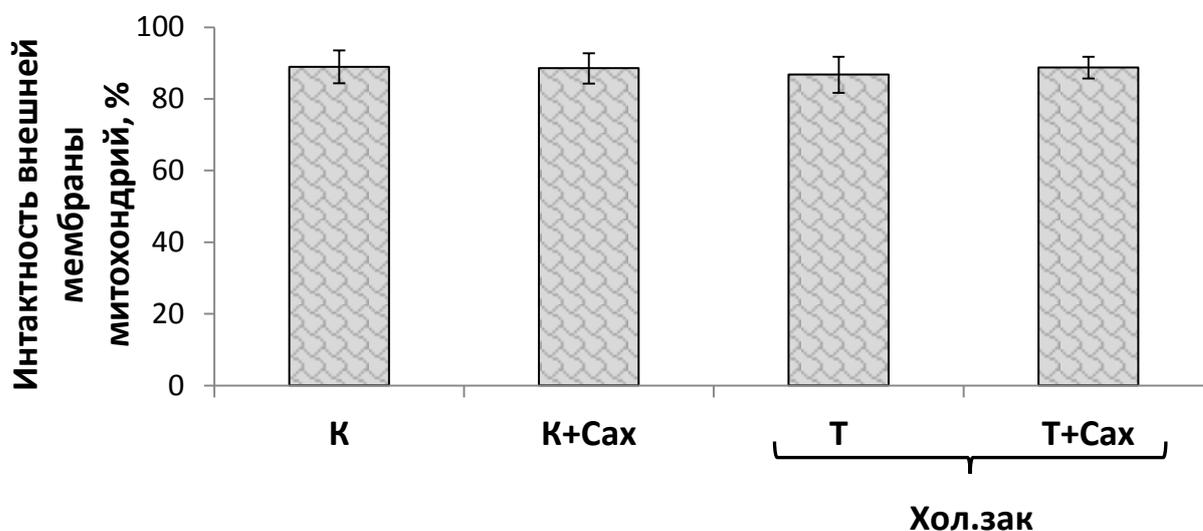


Рис. 31. Влияние экзогенной сахарозы и холодового закаливания на интактность внешней мембраны митохондрий из этиолированных листьев озимой пшеницы.

Обозначения: К – контрольные растения, выращенные при 22 °С в темноте в течение 7,5 суток; К+Сах – 7-ми суточные контрольные растения, выращенные при 22 °С на растворе 12%-ой сахарозы в течение 7 суток; Т – 7-ми суточные контрольные растения, закаленные при 2 °С в темноте в течение 7 суток; Т+Сах – 7-ми суточные контрольные растения, закаленные в темноте на растворе 12%-ой сахарозы в течение 7 суток. Хол.зак – холодовое закаливание. $n=3-6$. $M \pm S.D.$

Для определения окислительной активности изолированных

митохондрий в качестве субстратов для дыхания использовали малат, малат в присутствии ротенона, сукцинат, НАД·Н и НАДФ·Н. Самый высокий коэффициент ДК и значение отношения АДФ:О в контрольных условиях наблюдали при окислении митохондриями малата (табл. 3).

Таблица 3

Величина коэффициента дыхательного контроля (КДК) и отношение АДФ:О в митохондриях из этилированных листьев озимой пшеницы, подвергнутых холодному закаливанию

Вариант	К	К+Сах	Т	Т+Сах
<i>Малат</i>				
КДК	2,11±0,04	1,89±0,28	1,66±0,04	1,69±0,07
АДФ:О	1,66±0,17	2,50±0,30	1,70±0,04	1,94±0,22
<i>Малат+Ротенон</i>				
КДК	1,41±0,09	1,40±0,05	1,39±0,19	1,36±0,15
АДФ:О	1,30±0,01	2,13±0,34	1,65±0,17	1,68±0,15
<i>Сукцинат</i>				
КДК	1,37±0,03	1,13±0,02	1,26±0,02	1,27±0,05
АДФ:О	1,04±0,10	1,41±0,23	1,15±0,07	1,31±0,06
<i>НАД·Н</i>				
КДК	1,27±0,18	1,32±0,14	1,29±0,10	1,19±0,12
АДФ:О	0,63±0,11	1,17±0,10	0,70±0,24	0,67±0,25
<i>НАДФ·Н</i>				
КДК	1,31±0,19	1,38±0,12	1,20±0,07	1,24±0,11
АДФ:О	0,78±0,06	1,17±0,04	0,68±0,18	0,61±0,05

Примечания: Обозначения как на рис. 31 и 32. n=3-6. М±S.D.

При окислении малата митохондриями из контрольных растений КДК был равен 2,11, митохондриями из растений, выращенных на растворе сахарозы в контрольных условиях, КДК=1,89, митохондриями из закаленных в присутствии сахарозы и ее отсутствие КДК был равен 1,69 и 1,66,

соответственно (табл. 3).

При выращивании растений на растворе сахарозы в контрольных условиях наблюдали повышение отношения АДФ:О в митохондриях независимо от субстрата окисления. Наибольшая величина АДФ:О в этих условиях выращивания была у митохондрий при окислении малата и малата в присутствии ротенона, она равнялась 2,50 и 2,13, соответственно (табл. 3).

Митохондрии из этиолированных листьев окисляли все использованные в работе субстраты – малат, малат в присутствии ротенона, сукцинат, НАД·Н и НАДФ·Н (рис. 32). Митохондрии из листьев контрольных растений с наибольшей скоростью окисляли малат и экзогенный НАД·Н и с наименьшей – малат в присутствии ротенона (рис. 32).

Низкая температура и выращивание растений на растворе сахарозы влияли на дыхательную активность митохондрий, наиболее выраженные изменения наблюдали при выращивании этиолированных растений на растворе сахарозы в контрольных условиях [7]. Дыхательная активность митохондрий при окислении малата увеличивалась (в 1,4 раза) в листьях растений, выращенных на сахарозе в контрольных условиях, и снижалась при закаливании растений как в темноте, так и в темноте на растворе сахарозы. Увеличение дыхательной активности при выращивании на сахарозе было обусловлено увеличением вклада в дыхание как ЦП (в 1,3 раза), так и АП (в 1,4 раза) (рис. 32).

По сравнению с контрольными растениями при холодовом закаливании на растворе сахарозы при окислении малата наблюдали увеличение АП в 1,2 раза (рис. 32). Дыхание митохондрий, окисляющих малат, при выращивании растений на сахарозе в контрольных условиях по сравнению с закаленными на сахарозе растениями было выше на 52%, в то же время вклад АП в дыхание не отличался (рис. 32).

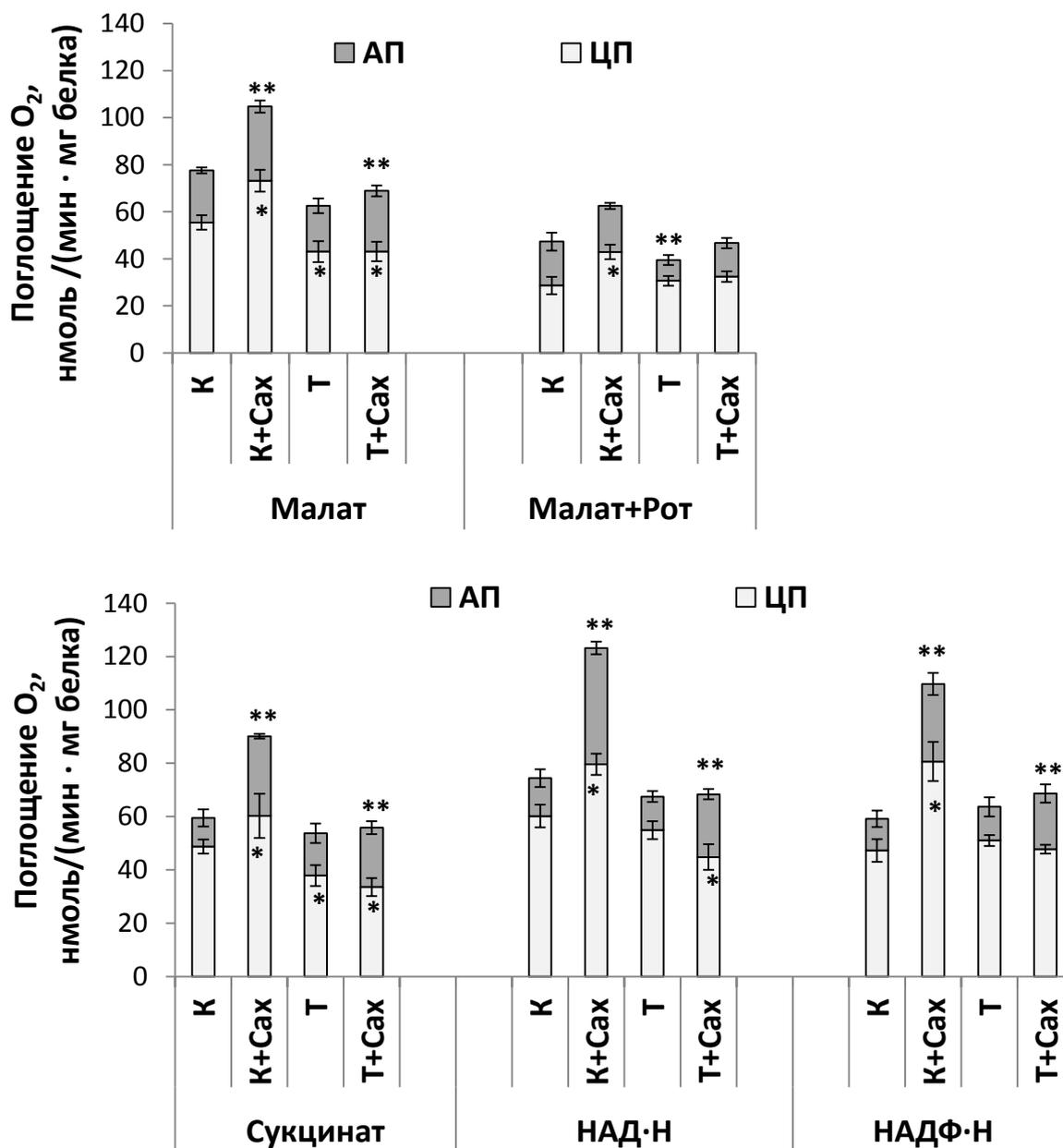


Рис. 32. Влияние экзогенной сахарозы и холодового закаливания на дыхательную активность митохондрий из этиолированных листьев и вклад в дыхание цитохромного (ЦП) и альтернативного (АП) путей при окислении различных субстратов.

Обозначения: К, К+Сах, Т, Т+Сах – как на рис. 31. Малат – 10 мМ малат в присутствии 10 мМ глутамата; Малат+Рот – 10 мМ малат в присутствии 10 мМ глутамата и 3 мкМ ротенона; Сукцинат – 8 мМ сукцинат в присутствии 5 мМ глутамата и 3 мкМ ротенона; НАД·Н – 1 мМ НАД·Н в присутствии 3 мкМ ротенона и 0,06 мМ Ca^{2+} ; НАДФ·Н – 1 мМ НАДФ·Н в присутствии 3 мкМ ротенона и 0,06 мМ Ca^{2+} . $n=3-6$. $M \pm S.D.$ * – различия между вариантом К и исследуемым вариантом статистически значимы (ЦП); ** – различия между вариантом К и исследуемым вариантом статистически значимы (АП). Статистическую значимость различий определяли по критерию Фишера.

При окислении малата в присутствии ротенона скорость дыхания была

выше в митохондриях из листьев растений, выращенных на сахарозе в контрольных условиях (в 1,3 раза по сравнению с митохондриями контрольных растений) (рис. 32). Увеличение скорости дыхания было обусловлено увеличением ЦП. При закаливании растений в темноте дыхание митохондрий снижалось, при этом наблюдалось снижение АП. При закаливании растений на сахарозе скорость ротенон-нечувствительного окисления малата митохондриями не изменялась (рис. 32).

Выращивание растений на растворе сахарозы в контрольных условиях сопровождалось увеличением скорости окисления митохондриями сукцината (в 1,5 раза), что было обусловлено увеличением вклада в дыхание АП (в 2,8 раза). Скорость окисления сукцината не изменялась при холодовом закаливании как в отсутствие, так и присутствии сахарозы (рис. 32). Однако при закаливании на растворе сахарозы снижался вклад ЦП в дыхание (в 1,5 раза) и на этом фоне увеличился вклад АП (в 2,1 раза). При закаливании в темноте также наблюдали снижение ЦП при неизменном вкладе в дыхание АП.

Выращивание растений на растворе сахарозы в контрольных условиях увеличивало скорость окисления митохондриями НАД·Н в 1,7 раз, что было обусловлено увеличением вклада в дыхание как ЦП (в 1,3 раза), так и АП (в 3,1 раза) (рис. 32). Холодовое закаливание не влияло на скорость окисления НАД·Н митохондриями, однако приводило к перераспределению вклада в дыхание ЦП и АП в митохондриях листьев растений, закаленных на сахарозе. При закаливании на растворе сахарозы вклад ЦП в дыхание снижался в 1,3 раза, а вклад АП в дыхание увеличивался в 1,7 раза (рис. 32).

Следует отметить, что митохондрии из листьев растений, закаленных на растворе сахарозы, по сравнению с митохондриями из растений, выращенных на сахарозе в контрольных условиях, характеризуются снижением дыхательной активности при окислении НАД·Н, что в равной мере было обусловлено снижением вклада в дыхание ЦП и АП (рис. 32).

При выращивании растений на растворе сахарозы в контрольных

условиях в 1,9 раза увеличивалось окисление экзогенного НАДФ·Н, при этом наблюдали увеличение вклада в дыхание как ЦП (в 1,7 раза), так и АП (в 2,5 раза) (рис. 32). Холодовое закаливание в отсутствие сахарозы не влияло на скорость окисления НАДФ·Н митохондриями и вклад ЦП и АП в дыхание. В то же время закаливание на растворе сахарозы увеличивало скорость дыхания митохондрий при окислении НАДФ·Н, что было связано с увеличением вклада в дыхание АП (в 1,8 раза) (рис. 32). Закаливание растений на сахарозе, в отличие от выращивания на сахарозе растений в контрольных условиях, характеризовалось снижением дыхательной активности митохондрий при окислении НАДФ·Н за счет снижения вклада в дыхание и ЦП (в 1,7 раза) и АП (в 1,4 раза).

3.4.1.2. Функционирование альтернативных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ и альтернативной оксидазы

С использованием изолированных из этиолированных листьев митохондрий после действия на растения низкой закаливающей температуры и экзогенной сахарозы показаны изменения в активности ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-ДГ и альтернативной оксидазы и в содержании этих белков.

О функционировании «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа судили по окислению малата в присутствии ингибитора комплекса I дыхательной цепи – ротенона, содержание белков оценивали с помощью антител против NDA [180]. Как видно из рис. 32, функционирование ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-ДГ было сопряжено с транспортом электронов через ЦО и АО. Функционирование этих дегидрогеназ увеличивалось в митохондриях растений, выращенных на растворе сахарозы в контрольных условиях, и это увеличение было связано с транспортом электронов по ЦП. Низкая температура снижала функционирование «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа, в то время как экзогенная сахароза поддерживала их активность в этих условиях (рис. 32). Снижение функционирования «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ при закаливании было связано со снижением транспорта электронов

через АП (рис. 32). Иммуноблоттинг с антителами против NDA выявил присутствие в митохондриях этиолированных листьев двух полипептидов с мол. массами 63 и 56 кД, содержание полипептида с мол. массой 63 кД снижалось при закаливании. Содержание полипептида NDA с мол. массой 56 кД увеличивалось при закаливании этиолированных растений на растворе сахарозы (рис. 33).

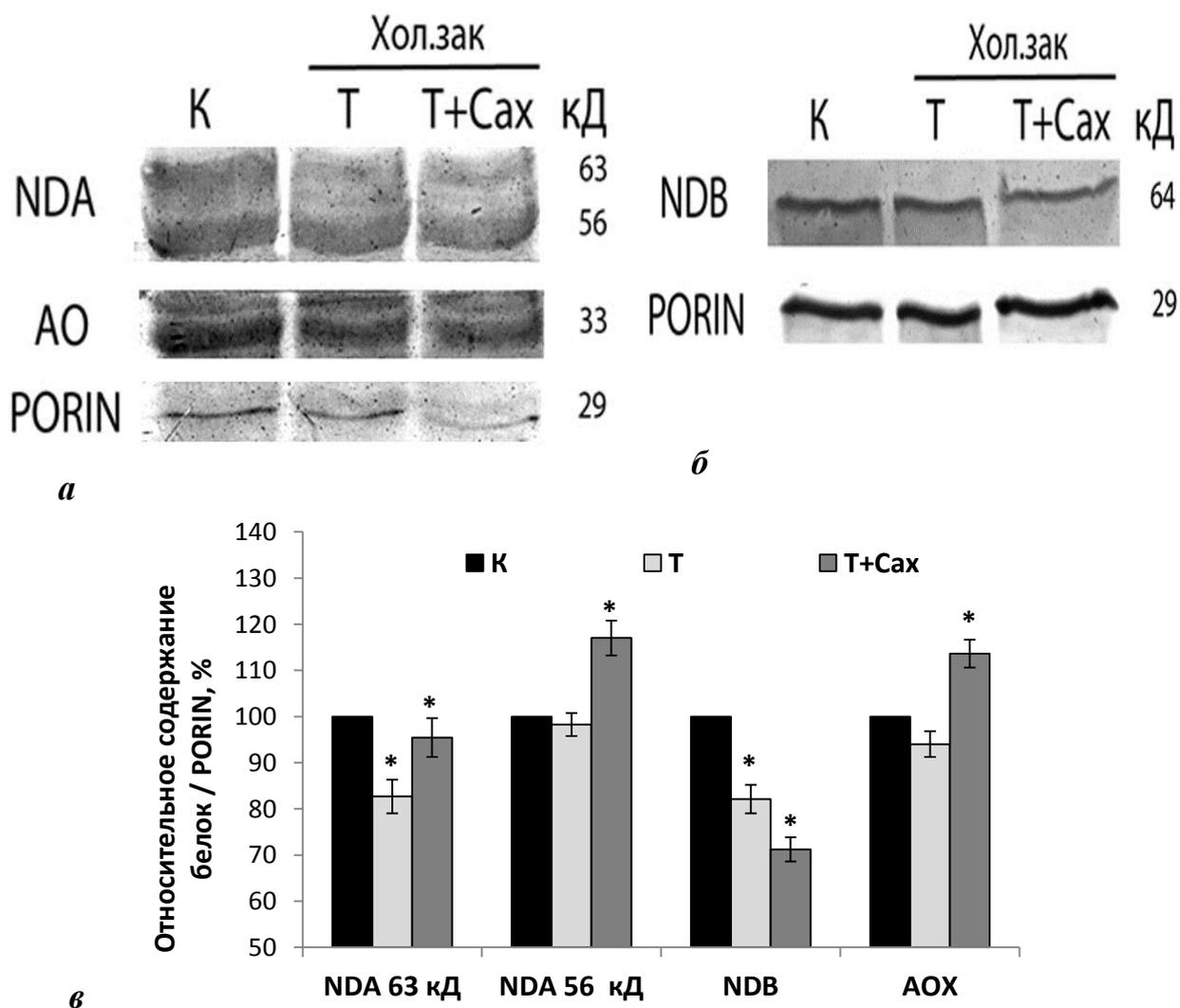


Рис. 33. Влияние холодового закаливания на содержание белков альтернативной оксидазы (АО), «внутренних» (NDA) и «внешних» (NDB) НАД(Ф)·Н-ДГ II типа в митохондриях из этиолированных листьев озимой пшеницы.

а, б – иммунофореграмма, *в* – относительное содержание исследуемых белков к порину.

Обозначения: К, Т, Т+Сах, Хол.зак – как на рис. 31; кД – молекулярные массы белков. $n=3$. $M \pm S.D.$ * – различия между вариантом К и исследуемым вариантом статистически значимы по t-критерию Стьюдента.

О функционировании «внешних» НАД·Н-ДГ и НАДФ·Н-ДГ в

митохондриях судили по окислению экзогенных НАД·Н или НАДФ·Н в присутствии ротенона и Ca^{2+} , исключая из реакционной среды хелатирующий агент ЭДТА. Содержание белков оценивали с помощью антител против NDB [180].

Функционирование «внешних» НАД(Ф)·Н-ДГ было выше по сравнению с «внутренними» и в отличие от «внутренних» было в большей степени сопряжено с транспортом электронов через ЦП (рис. 32). Функционирование «внешних» НАД(Ф)·Н-ДГ увеличивалось на сахарозе в контрольных условиях, что было связано с увеличением вклада в дыхание ЦП и АП, но гораздо больше АП (рис. 32). Низкая температура не влияла на функционирование «внешних» НАД(Ф)·Н-ДГ, однако в этих условиях усиливался транспорт электронов от этих дегидрогеназ на АП (рис. 32). Иммуноблоттинг с антителами против NDB выявил присутствие в митохондриях этиолированных листьев одного полипептида с мол. массой 64 кД, содержание которого снижалось при закаливании (рис. 33).

Функционирование АО в митохондриях оценивали с помощью ингибиторов ЦП и АП – KCN и БГК, соответственно. Вклад АП, связанного с функционированием АО, рассчитывали в % как дыхание, ингибируемое БГК в присутствии KCN (потенциальная активность АО). В контрольных условиях активность АО была наибольшей при окислении малата и малата в присутствии ротенона (рис. 32). Экзогенная сахароза как в контрольных условиях, так и при действии низкой температуры увеличивала активность АО в митохондриях при окислении всех использованных субстратов, за исключением малата в присутствии ротенона (рис. 32). Наибольшее увеличение АО наблюдали при выращивании этиолированных растений на сахарозе в контрольных условиях. Иммуноблоттинг с антителами против АО позволил выявить полипептид с мол. массой 33 кД, содержание которого при закаливании на растворе сахарозы увеличивалось (рис. 33).

3.4.2. Митохондрии из листьев зеленых растений

3.4.2.1. Окислительная и фосфорилирующая активность митохондрий

При выделении митохондрий из зеленых листьев растений возникают трудности, связанные с загрязнением митохондриальной фракции хлоропластами. Этого можно избежать, используя очистку грубой фракции митохондрий в градиенте плотности перколла [122, 159]. Содержание хлорофилла (сумма Хл *a* и *b*) во фракции очищенных таким образом митохондрий составляло не более 3-5% от его содержания в грубой фракции митохондрий.

Очищенные из зеленых листьев озимой пшеницы митохондрии характеризовались высокой интактностью внешней мембраны, которая составляла 82-90% (рис. 34).

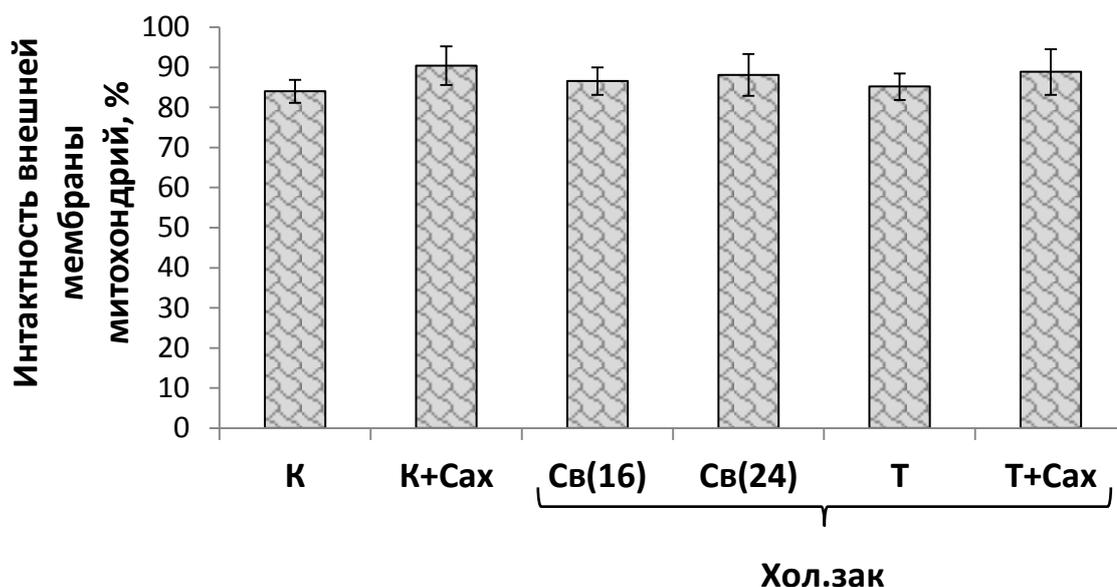


Рис. 34. Влияние экзогенной сахарозы и холодового закаливания на интактность внешней мембраны митохондрий, изолированных из зеленых листьев озимой пшеницы.

Обозначения: К – контрольные растения, выращенные при 23/20 °С (16 ч фотопериод) в течение 9 суток; К+Сах – контрольные растения, выращенные при 22 °С на растворе 12%-ой сахарозы в течение 7 суток; Св(16) – контрольные растения, закаленные при 5/2 °С (16 ч фотопериод) в течение 7 суток; Св(24) – контрольные растения, закаленные при 5 °С (24 ч фотопериод) в течение 7 суток; Т – контрольные растения, закаленные при 2 °С в темноте в течение 7 суток; Т+Сах – контрольные растения, закаленные при 2 °С в темноте на растворе 12%-ой сахарозы в течение 7 суток. Хол.зак – холодовое закаливание. $n=3-8$. $M\pm S.D.$

В качестве субстратов дыхания митохондрии окисляли малат, малат в присутствии ротенона, сукцинат, глицин, НАД·Н и НАДФ·Н. Как оказалось, митохондрии из зеленых листьев с наиболее высокой скоростью окисляли НАД·Н и НАДФ·Н, в то время как окисление сукцината и глицина было ниже, а окисление малата практически полностью было ротенон-нечувствительным (рис. 35). Самый высокий коэффициент ДК наблюдали при окислении митохондриями малата (табл. 4). При окислении малата митохондриями из контрольных растений КДК был равен 1,71, из растений, выращенных на растворе сахарозе в контрольных условиях, КДК=2,08 и в закаленных в условиях непрерывного освещения КДК=1,95. Самое высокое отношение АДФ:О (2,14) было при окислении малата митохондриями из листьев контрольных растений (табл. 4).

Окисление малата митохондриями увеличивалось при выращивании растений на растворе сахарозы в контрольных условиях, не изменялось при закаливании на растворе сахарозы и в условиях круглосуточного освещения и снижалось в остальных вариантах закаливания (рис. 35). Увеличение (в 1,3 раза) скорости окисления малата митохондриями при выращивании контрольных растений на сахарозе происходило за счет увеличения транспорта электронов через ЦП. Закаливание растений в темноте на растворе сахарозы, хотя и не влияло на окислительную активность митохондрий, но приводило к перераспределению участия дыхательных путей: снижению вклада ЦП в дыхание (в 1,3 раза) и увеличению вклада АП в дыхание (в 1,8 раза) (рис. 35). Снижение скорости дыхания при окислении малата в митохондриях из листьев закаленных при 16 ч фотопериоде растений было обусловлено снижением вклада в дыхание ЦП (в 1,3 раза). При закаливании в условиях непрерывного освещения наблюдали перераспределение участия дыхательных путей: снижение вклада в дыхание ЦП (в 1,4 раза) и увеличение вклада в дыхание АП (в 1,6 раза) (рис. 35).

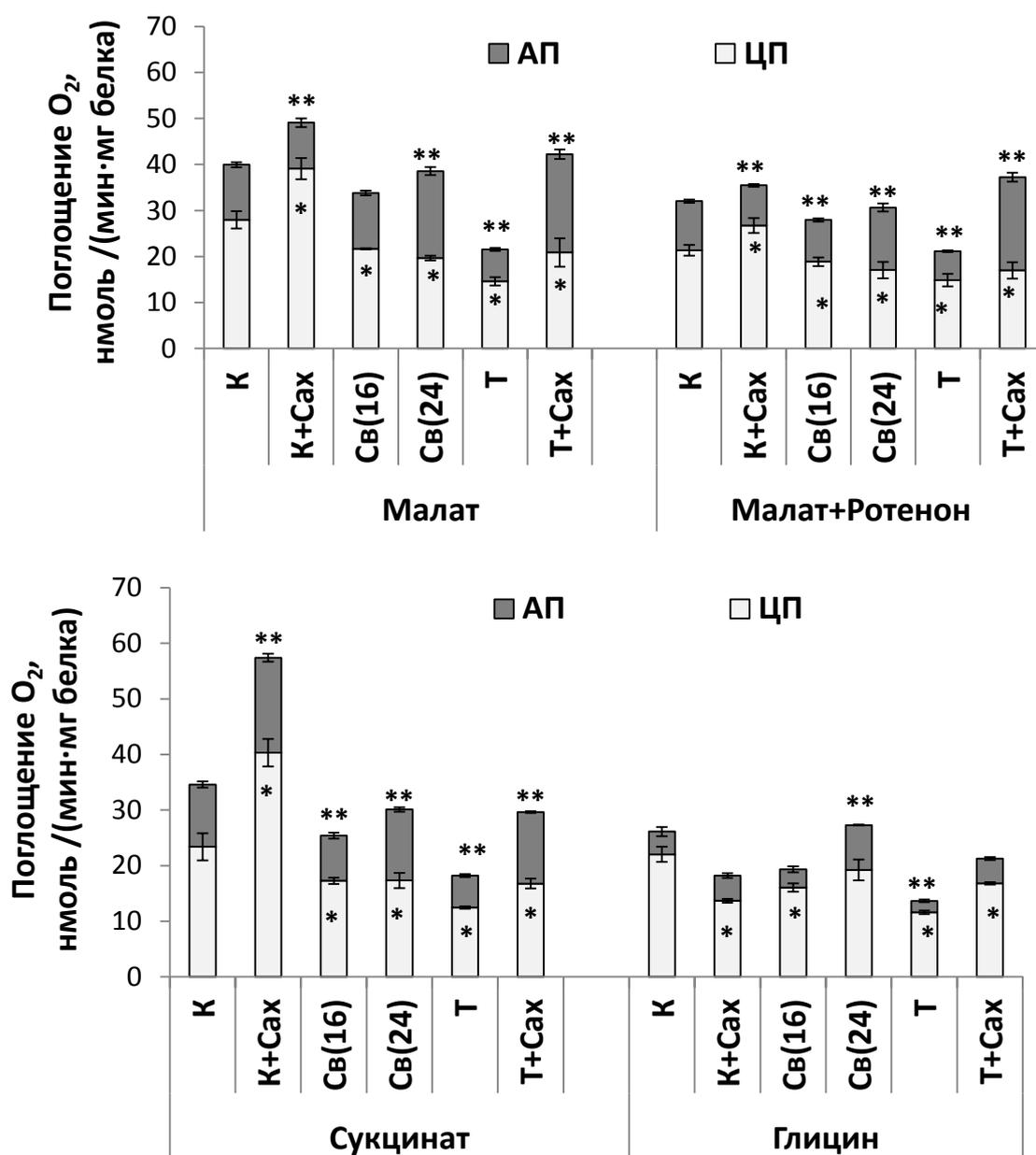


Рис. 35. Влияние экзогенной сахарозы и холодового закаливания на дыхательную активность митохондрий и вклад цитохромного (ЦП) и альтернативного (АП) путей в дыхание митохондрий зеленых листьев при окислении ряда субстратов.

Обозначения: К, К+Сах, Св(16), Св(24), Т, Т+Сах – как на рис. 34. Малат – 10 мМ малат в присутствии 10 мМ глутамата; Малат+Рот – 10 мМ малат в присутствии 10 мМ глутамата и 3 мкМ ротенона; Сукцинат – 8 мМ сукцинат в присутствии 5 мМ глутамата и 3 мкМ ротенона; Глицин – 10 мМ глицин в присутствии 0,2 мМ НАД⁺. $n=3-6$. $M \pm S.D.$ * – различия между вариантом К и исследуемым вариантом статистически значимы (ЦП); ** – различия между вариантом К и исследуемым вариантом статистически значимы (АП). Статистическую значимость различий определяли по критерию Фишера.

Значительное снижение скорости окисления малата митохондриями из листьев растений, закаленных в темноте происходило за счет снижения

вклада в дыхание и ЦП (в 1,9 раза), и АП (в 1,7 раза). Сравнительный анализ митохондрий из листьев контрольных растений, выращенных на растворе сахарозы, и митохондрий из листьев растений, закаленных на растворе сахарозы, выявил после закаливания сниженную дыхательную активность митохондрий при окислении малата, при этом вклад ЦП в дыхание снижался в 1,9 раза, а вклад АП в дыхание увеличивался в 2,1 раза (рис. 35).

Окисление малата в присутствии ротенона митохондриями, так же как и окисление малата в отсутствие ротенона, увеличивалось при выращивании растений на растворе сахарозы в контрольных условиях и при закаливании на сахарозе, не изменялось при закаливании в условиях непрерывного освещения и снижалось при остальных вариантах закаливания (рис. 35).

Увеличение ротенон-нечувствительного дыхания в митохондриях контрольных растений при их выращивании на растворе сахарозы было обусловлено увеличением вклада ЦП в дыхание (в 1,3 раза) и снижением вклада АП в дыхание (в 1,2 раза). Увеличение окислительной активности митохондрий при окислении малата в присутствии ротенона в листьях закаленных на растворе сахарозы растений было обусловлено снижением вклада ЦП в дыхание (в 1,3 раза) и увеличением вклада АП в дыхание (в 1,9 раза) (рис. 35). Закаливание в условиях круглосуточного освещения хоть и не влияло на скорость ротенон-нечувствительного дыхания в митохондриях, но приводило к перераспределению дыхательных путей: к снижению ЦП (в 1,3 раза) и увеличению АП (в 1,3 раза). Окисление малата в присутствии ротенона митохондриями из закаленных на сахарозе растений не отличалось от такового в митохондриях из листьев растений, выращенных на сахарозе при 22 °С, однако вклад АП в дыхание при закаливании был выше в 2,3 раза (рис. 35).

Окисление сукцината митохондриями увеличивалось при выращивании растений на растворе сахарозы в контрольных условиях и снижалось при холодном закаливании растений независимо от светового режима и присутствия сахарозы. Увеличение скорости окисления сукцината

митохондриями из листьев контрольных растений, выращенных на растворе сахарозы, в равной мере было обусловлено увеличением вклада дыхания и ЦП (1,7 раза) и АП (в 1,5 раза) (рис. 35). Закаливание при 16 ч фотопериоде снижало сукцинат-зависимое дыхание, что было связано со снижением ЦП и АП на 35,4 и 37,9%, соответственно.

Таблица 4

Величина коэффициента дыхательного контроля (КДК) и отношение АДФ:О в митохондриях из зеленых листьев озимой пшеницы, подвергнутых холодовому закаливанию

Вариант	К	К+Сах	Св(16)	Св(24)	Т	Т+Сах
<i>Малат</i>						
КДК	1,71±0,11	2,08±0,16	1,31±0,02	1,95±0,10	1,22±0,01	1,46±0,28
АДФ:О	2,15±0,12	1,62±0,14	1,41±0,07	1,55±0,08	1,34±0,21	1,35±0,18
<i>Малат+Ротенон</i>						
КДК	1,23±0,09	1,57±0,05	1,33±0,19	1,26±0,17	1,27±0,16	1,33±0,12
АДФ:О	0,85±0,09	1,39±0,07	0,69±0,16	1,48±0,22	1,17±0,32	1,10±0,16
<i>Сукцинат</i>						
КДК	1,24±0,16	1,46±0,19	1,32±0,17	1,16±0,03	1,21±0,03	1,17±0,03
АДФ:О	1,18±0,29	1,68±0,01	0,96±0,08	0,95±0,26	1,13±0,04	0,88±0,15
<i>Глицин</i>						
КДК	1,34±0,12	1,46±0,19	1,18±0,17	1,16±0,01	1,26±0,18	1,21±0,06
АДФ:О	1,69±0,10	0,74±0,04	1,39±0,07	1,35±0,25	1,56±0,34	1,63±0,02
<i>НАД·Н</i>						
КДК	1,37±0,01	1,60±0,23	1,35±0,11	1,38±0,12	1,29±0,04	1,31±0,03
АДФ:О	1,16±0,03	1,14±0,02	1,36±0,07	1,22±0,03	1,18±0,44	0,86±0,20
<i>НАДФ·Н</i>						
КДК	1,26±0,05	1,58±0,35	1,21±0,14	1,22±0,06	1,26±0,11	1,22±0,10
АДФ:О	1,18±0,12	1,14±0,16	0,90±0,25	1,10±0,06	1,50±0,21	1,19±0,11

Примечание: обозначения как на рис. 34, 35. n=3-6. М±S.D.

При закаливании в условиях непрерывного освещения наблюдали снижение окислительной активности митохондрий при использовании

сукцината как субстрата дыхания, при этом на фоне снижения вклада ЦП в дыхание (в 1,4 раза) наблюдали увеличение вклада АП (в 1,2 раза). Закаливание растений в темноте снижало дыхание, что было связано со снижением вклада как ЦП, так и АП (на 88 и 94,6%, соответственно). Закаливание растений на растворе сахарозы приводило к снижению скорости сукцинат-зависимого дыхания, при этом на фоне снижения ЦП (на 39,4%) наблюдали увеличение вклада в дыхание АП (на 14,7%). Закаленные на сахарозе растения по сравнению с растениями, выращенными на сахарозе в контрольных условиях, характеризовались снижением дыхания митохондрий при окислении сукцината, что было связано со снижением ЦП и АП – в 2,4 и 1,3 раза, соответственно (рис. 35).

Скорость окисления митохондриями глицина при выращивании растений на сахарозе в контрольных условиях и при всех вариантах закаливания, за исключением закаливания при 24 ч фотопериоде, была ниже, по сравнению с митохондриями из контрольных растений (рис. 35). При окислении глицина наблюдаемое снижение скорости дыхания митохондриями из листьев растений, выращенных на сахарозе в контрольных условиях, происходило за счет снижения вклада в дыхание ЦП (на 61%). При закаливании в темноте, в темноте на растворе сахарозы и при 16 ч фотопериоде снижение скорости окисления митохондриями глицина также было обусловлено снижением вклада в дыхание ЦП (рис. 35). Закаливание растений в условиях непрерывного освещения не влияло на скорость окисления глицина, однако вызывало перераспределение путей дыхания в сторону значительного увеличения вклада АП (в 2 раза). Закаливание на сахарозе по сравнению с выращиванием растений на сахарозе при 22 °С не влияло на скорость глицин-зависимого дыхания, однако при закаливании наблюдали увеличение вклада ЦП в дыхание в 1,2 раза (рис. 35).

Окисление экзогенного НАД·Н митохондриями увеличивалось при выращивании растений на растворе сахарозы в контрольных условиях, не изменялось при закаливании растений на сахарозе и на круглосуточном свете

и снижалось при закаливании в условиях 16 ч фотопериода и в темноте (рис. 36). Скорость окисления НАД·Н митохондриями из листьев растений, выращенных в контрольных условиях на растворе сахарозы, была больше по сравнению с таковой в митохондриях из контрольных растений, и это увеличение было связано с вкладом в дыхание АП (в 1,2 раза) (рис. 36). В митохондриях растений, закаленных на растворе сахарозы, при окислении НАД·Н наблюдали перераспределение транспорта электронов между ЦП и АП в сторону увеличения вклада в дыхание АП (снижение ЦП в 1,4 раза и увеличение АП в 1,8 раза). Закаливание на круглосуточном свете, хотя не влияло на скорость окислительной активности митохондрий, но также вызывало перераспределение потока электронов по дыхательной цепи: снижение вклада в дыхание ЦП (в 1,3 раза) и увеличение вклада в дыхание АП (в 1,7 раза) (рис. 36).

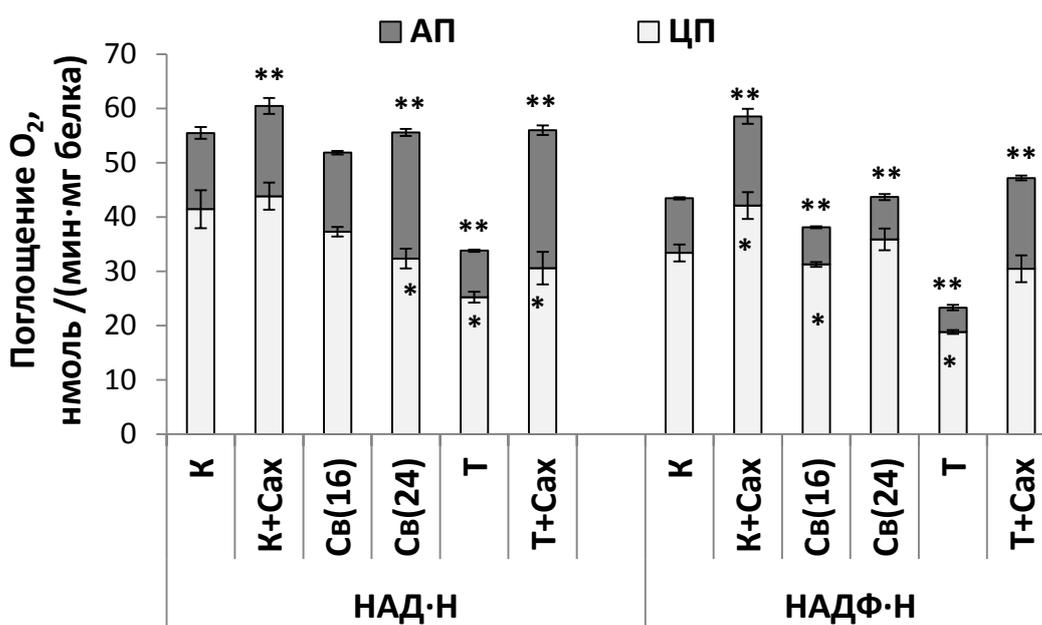


Рис. 36. Влияние экзогенной сахарозы и холодового закаливания на дыхательную активность митохондрий и вклад цитохромного (ЦП) и альтернативного (АП) путей в дыхание митохондрий зеленых листьев при окислении экзогенных НАД·Н и НАДФ·Н.

Обозначения: К, К+Сах, Св(16), Св(24), Т, Т+Сах – как на рис. 34. НАД·Н – 1 мМ НАД·Н в присутствии 3 мкМ ротенона и 0,06 мМ Ca^{2+} ; НАДФ·Н – 1 мМ НАДФ·Н в присутствии 3 мкМ ротенона и 0,06 мМ Ca^{2+} . $n=3-6$. $M \pm S.D.$ * – различия между вариантом К и исследуемым вариантом статистически значимы (ЦП); ** – различия между вариантом К и исследуемым вариантом статистически значимы (АП). Статистическую значимость различий определяли по критерию Фишера.

Снижение скорости окисления НАД·Н при закаливании в темноте было связано со снижением транспорта электронов как через ЦП, так и АП. Окисление НАД·Н митохондриями при закаливании растений на сахарозе по сравнению с митохондриями растений, выращенных на сахарозе в контрольных условиях, снижалось за счет ингибирования ЦП (в 1,4 раза), однако при закаливании наблюдали увеличение вклада в дыхание АП (в 1,5 раза) (рис. 36).

Окисление экзогенного НАДФ·Н митохондриями из листьев контрольных растений было ниже, чем окисление НАД·Н (рис. 36). Скорость окисления НАДФ·Н увеличивалась при выращивании растений на растворе сахарозы в контрольных условиях и при закаливании растений на сахарозе, не изменялась при закаливании растений на круглосуточном свете и снижалась при закаливании в условиях 16 ч фотопериода и в темноте. Скорость окисления НАДФ·Н митохондриями из листьев растений, выращенных в контрольных условиях на растворе сахарозы, была выше по сравнению с таковой в митохондриях из контрольных растений, и это увеличение было связано с вкладом в дыхание ЦП (в 1,3 раза) и АП (в 1,6 раза) (рис. 36). Некоторое увеличение скорости окисления НАДФ·Н в митохондриях растений, закаленных на растворе сахарозы, было связано с увеличением вклада в дыхание АП (в 1,7 раза). Закаливание на круглосуточном свете не влияло на скорость окисления НАДФ·Н митохондриями, но сопровождалось снижением вклада в дыхание АП в 1,3 раза. Закаливание в условиях 16 ч фотопериода и в темноте снижало скорость дыхания митохондрий при окислении НАДФ·Н, при этом наблюдали снижение вклада в дыхание и ЦП, и АП (рис. 36).

3.4.2.2. Функционирование альтернативных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ и альтернативной оксидазы

Функционирование «внутренних» и «внешних» НАД(Ф)·Н-ДГ и АО в изолированных из листьев зеленых растений озимой пшеницы митохондриях определяли так же как и для митохондрий из этиолированных листьев (см.

гл. 3.4.1.2). В зеленых листьях отмечена высокая активность «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа и «внешних» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа в контрольных условиях (рис. 35, 36). О высокой активности «внутренних» ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-ДГ в зеленых листьях свидетельствует тот факт, что дыхание митохондрий при окислении малата было почти полностью ротенон-нечувствительным (рис. 35).

Функционирование «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа в митохондриях увеличивалось при выращивании растений на сахарозе независимо от температурного режима (рис. 35). Однако, если при закаливании на растворе сахарозы их функционирование было связано с АП, то в контрольных условиях – с ЦП. При закаливании в темноте и при 16 ч фотопериоде функционирование «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа снижалось, однако при 24 ч фотопериоде не изменялось (рис. 35). Стоит отметить, что функционирование «внутренних» ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-ДГ в митохондриях при закаливании в условиях непрерывного освещения было сопряжено с активностью АО.

Функционирование «внешних» НАД(Ф)·Н-ДГ увеличивалось при выращивании растений на растворе сахарозы как в контрольных условиях, так и при закаливании (рис. 36). Отличием явилось более сильное увеличение вклада АП при окислении НАД·Н митохондриями при закаливании на сахарозе. Выявлены различия в функционировании «внешней» НАД·Н-ДГ и «внешней» НАДФ·Н-ДГ в митохондриях из растений, закаленных в условиях круглосуточного освещения. Так, если функционирование «внешней» НАД·Н-ДГ в этих условиях было связано с увеличением потока электронов через АП, то функционирование «внешней» НАДФ·Н-ДГ – с ЦП (рис. 36). Функционирование «внешних» НАД(Ф)·Н-ДГ в митохондриях зеленых листьев снижалось при закаливании растений в темноте и на 16 ч фотопериоде.

В контрольных условиях активность АО при окислении малата, малата в присутствии ротенона, НАД·Н и НАДФ·Н была сходной, в то время как при

окислении глицина она была минимальной (рис. 35, 36). Увеличение активности АО наблюдали при выращивании растений на растворе сахарозы в контрольных условиях при окислении митохондриями сукцината, НАД·Н и НАДФ·Н (рис. 35, 36). Закаливание растений на сахарозе сопровождалось значительным повышением активности АО при окислении митохондриями всех используемых субстратов, кроме глицина (рис. 35, 36). 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. 35, 36). Особенно значительным можно считать увеличение в этих условиях активности АО при окислении глицина по сравнению с контролем, в котором ее функционированием было низким. 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. 35, 36).

В митохондриях из листьев зеленых растений озимой пшеницы были идентифицированы белки «внутренних» (NDA) и «внешних» (NDB) НАД(Ф)·Н-ДГ II типа с мол. массами 63 и 64 кД, соответственно, и полипептид АО с мол. массой 33 кД (рис. 37).

Закаливание проростков в темноте на растворе сахарозы приводило к увеличению содержания в митохондриях АО, закаливание проростков в условиях 16 ч и в темноте снижало содержание данного белка, а закаливание в условиях непрерывного освещения не влияло на его содержание (рис. 37). Содержание NDB в митохондриях после закаливания значительно не изменялось (за исключением закаливания на растворе сахарозы), в то время как содержание NDA снижалось (за исключением закаливания на растворе сахарозы) (рис. 37).

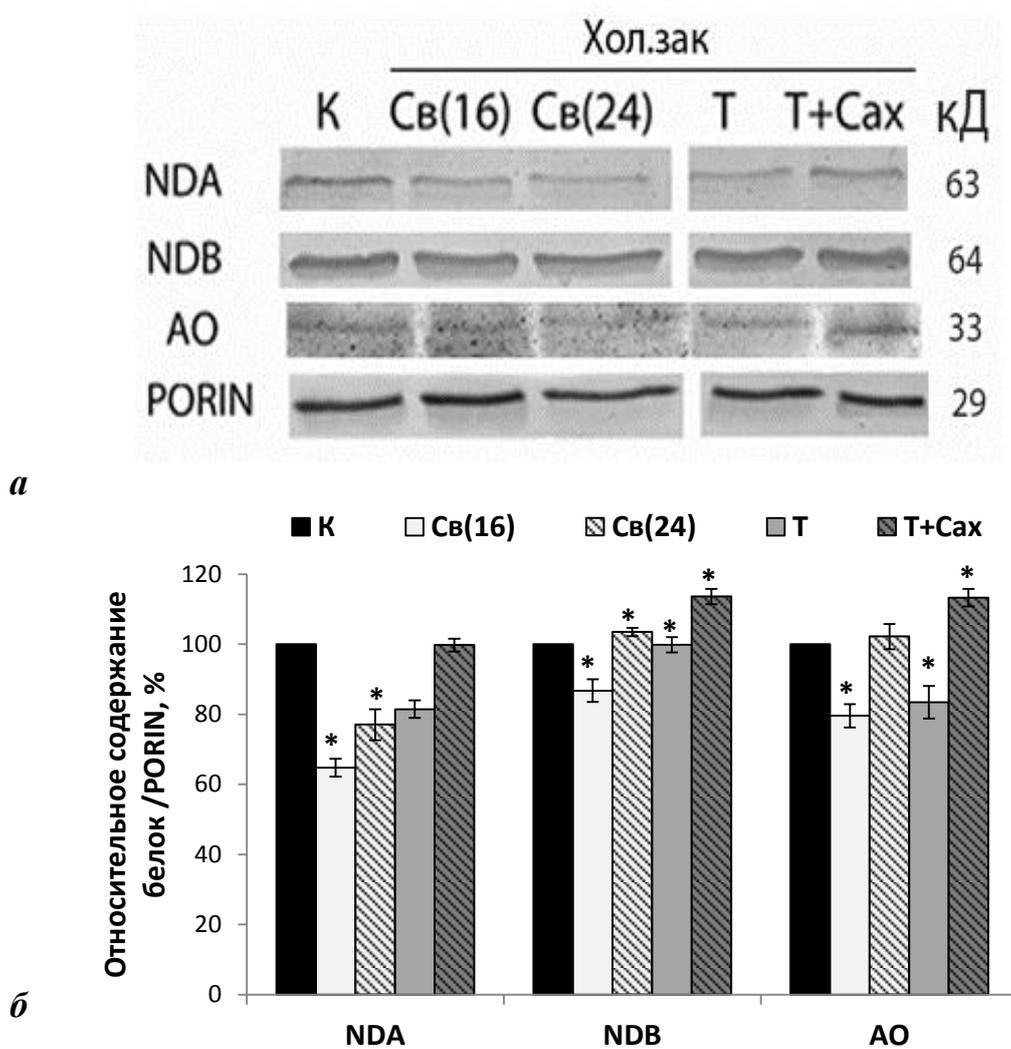


Рис. 37. Влияние холодового закаливания на содержание АО, NDA и NDB в митохондриях из зеленых листьев озимой пшеницы.

а – иммунофореграмма; **б** – относительное содержание исследуемых белков в пересчете на порин.

Обозначения: К, Св(16), Св(24), Т, Т+Сах – как на рис. 34. Хол.зак – холодовое закаливание. $n=3-4$. $M \pm S.D.$ * – различия между вариантом К и исследуемым вариантом статистически значимы по t-критерию Стьюдента.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. ОБЩИЕ МЕХАНИЗМЫ И ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ МОРОЗОУСТОЙЧИВОСТИ ЭТИОЛИРОВАННЫХ И ЗЕЛЕННЫХ РАСТЕНИЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

Как известно, повышение устойчивости озимых злаков к низким температурам в полевых условиях протекает в осенний период, когда температура окружающей среды снижается до 0 °С (+5 – 0 °С). Этот период называется первой фазой холодого закаливания и характеризуется следующими метаболическими изменениями – накоплением водорастворимых углеводов, накоплением аминокислот и стрессовых белков, изменением липидного и жирнокислотного состава мембран [17, 21, 40, 44]. В этот период происходит остановка роста, снижение оводненности тканей, снижение интенсивности дыхания и фотосинтеза [17, 21, 40, 44]. Прекращение растяжения клеток в этот период приводит к уменьшению гидратации ткани и может снижать вероятность образования внутриклеточного льда и повышать морозостойкость растений [17, 44]. Следующий период холодого закаливания (вторая фаза) начинается, когда температура окружающей среды снижается до отрицательных значений (-2 – -5 °С). Во время второй фазы закаливания в протопласте создаются условия, которые обеспечивает высокую проницаемость протопласта для воды, выносливость его к обезвоживанию и к механическим деформациям [44].

Подавление ростовых процессов при холодого закаливания происходит не только в результате понижения температуры, но и за счет накопления в тканях сахаров. Высокий уровень сахаров ингибирует рост проростков, подавляет экспрессию фотосинтетических генов и индуцирует экспрессию генов, необходимых для биосинтеза крахмала [186]. Свет влияет на морозоустойчивость озимых злаков благодаря накоплению сахаров и торможению ростовых процессов. Успешность холодого закаливания зависит от возраста клеток. Водорастворимые углеводы помимо

непосредственного защитного действия способствуют инактивации стимуляторов роста и накоплению ингибиторов роста, в частности АБК [43, 185, 186]. Важную роль в сахаро-зависимых путях выполняет АБК-зависимый транскрипционный регулятор (АВІ4) [186].

Холодовое закаливание можно моделировать в лабораторных условиях с использованием этиолированных или зеленых растений. Первая фаза холодого закаливания озимых злаков может протекать в темноте при условии, если находящиеся на холоде растения обеспечиваются в качестве источника энергии сахарами, или если они не исчерпали запасные вещества эндосперма [44]. Общий характер развития проростков злаков и изменение содержания в них сахаров известны с давних пор, при этом показано, что в течение первых 2-3 дней зародыш потребляет запасные вещества из собственных запасов, а затем использует запасы эндосперма [13]. По мере роста содержание сахаров в проростках снижается. Содержание сахаров значительно снижается при переходе от этиоляции к зеленению (деэтиоляция) [9]. Пул растворимых углеводов к концу деэтиоляции проростков яровой пшеницы снижался почти в 2 раза [9]. В процессе деэтиоляции число пластид, содержащих зерна крахмала, снижалось, при этом, спустя 6 ч зеленения, фиксировали отсутствие крахмала, что свидетельствует о полной реутилизации фонда запасенного углерода [9].

И хотя в естественных условиях закаливание протекает на свету и связано с фотосинтезом в листьях и образованием сахаров, в лабораторных условиях можно значительно повысить морозоустойчивость этиолированных и зеленых растений в темноте, проводя закаливание на растворах сахаров. Как показано И.И. Тумановым и сотрудниками его группы, высокая устойчивость озимой пшеницы достигалась при закаливании растений в условиях низкой положительной температуры (2 °С) на растворе сахарозы [44]. На колеоптилях были показаны защитные свойства и других сахаров, таких как глюкоза, фруктоза, мальтоза и рафиноза. Все эти сахара, включая сахарозу, не только проникают в клетки, но и превращаются в них в другие

формы, обеспечивая высокое содержание сахаров в тканях [44]. При закаливании на растворах этих сахаров внутри растительных клеток отмечали накопление преимущественно одних и тех же форм сахаров – глюкозы, фруктозы, сахарозы и олигосахаров разной полимерности [41]. Повышенное накопление сахарозы при закаливании – основное условие для образования олигосахаров [41]. Не повышали морозостойкость колеоптилей пентозы (арабиноза и ксилоза), гексозы (манноза и галактоза) и дисахариды (целлобиоза и лактоза), содержание сахаров при закаливании на этих углеводах значительно не изменялось [44]. Закаливание зеленых растений озимой пшеницы на растворе 12%-ой сахарозы было более эффективным, чем закаливание на растворах глюкозы, мальтозы, лактозы, рамнозы и галактозы такой же процентности [44]. Основываясь на этих фактах, в данной работе для повышения морозоустойчивости растений озимой пшеницы закаливание проводили на растворе 12%-ой сахарозы.

Закаливанию подвергали этиолированные проростки в возрасте 3-х суток, этиолированные и зеленые растения в возрасте 7-ми суток. Содержание сахаров было наибольшим в побегах этиолированных проростков и составляло 25,1% от сухого веса (рис. 12), снижалось до 6,2% от сухого веса в листьях этиолированных растений (рис. 23) и еще больше снижалось в листьях зеленых растений – до 2,2% от сухого веса (рис. 29). Это согласуется с литературными данными о расходовании сахаров на процессы роста и деэтиоляции [9, 13]. Чтобы повысить содержание сахаров в листьях этиолированных и зеленых растений применяли раствор 12%-ой сахарозы.

Применив схему закаливания, в которой этиолированные растения закаливали только при низкой положительной температуре или при низкой положительной температуре на растворе сахарозы, а зеленые растения закаливали при различных световых режимах или в темноте на растворе сахарозы, была подтверждена важная роль сахаров в механизмах морозоустойчивости и выявлена способность экзогенной сахарозы индуцировать синтез стрессовых белков дегидринов независимо от

температурного режима (рис. 24, 30).

Независимо от типа ткани (фотоавто- или гетеротрофная) и условий закаливания низкая температура приводила к ингибированию роста побегов проростков и растений озимой пшеницы (рис. 10а, 20, 26) и снижению содержания воды в побегах и листьях (рис. 10б, 21, 27).

Морозоустойчивость закаленных этиолированных и зеленых растений озимой пшеницы напрямую была связана с содержанием водорастворимых углеводов в листьях. Холодовое закаливание этиолированных и зеленых растений на растворе сахарозы и зеленых растений в условиях непрерывного освещения приводило к значительному увеличению содержания водорастворимых углеводов в листьях (рис. 23, 29). Сравнительный анализ влияния экзогенной сахарозы на рост этиолированных и зеленых растений озимой пшеницы выявил, что в отличие от этиолированных растений рост зеленых растений при выращивании на растворе сахарозы в темноте в контрольных условиях сильно ингибируется (рис. 20, 26). Также этиолированные растения, выращенные при 22 °С на растворе сахарозы, в отличие от зеленых растений, были способны накапливать гораздо больше сахаров (рис. 23, 29). Закаливание зеленых растений при разных условиях освещения также по-разному влияло на накопление водорастворимых углеводов в листьях (рис. 29). Увеличение длительности светового периода при закаливании зеленых растений сопровождалось повышением накопления сахаров в листьях (рис. 29). 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. Сохранение фотосинтетической активности хлоропластов при действии стрессовых факторов, возможно, благодаря функционированию в растительных клетках антиоксидантных ферментов и низкомолекулярных соединений. Так, показано, что СОД, аскорбатпероксидаза и каталаза обезвреживают АФК при избыточном освещении [164, 193]. Однако, если избыточное освещение

действует на растения совместно с действием другого стрессового фактора (например, низкой температуры), эти ферменты не справляются с детоксикацией АФК, что может вызвать ингибирование ФС I и II [164, 193]. Для снижения фотоингибирования при избыточном освещении могут быть задействованы механизмы активации альтернативных ферментов дыхательной цепи митохондрий – АО и ротенон-нечувствительные НАД(Ф)·Н-ДГ [95, 100, 117, 161, 228]. 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.

Следует отметить, что при перемещении зеленых растений озимой пшеницы в темноту на 7 суток при температуре 22 °С происходит пожелтение листьев (рис. 25). Такого не наблюдается при переносе зеленых растений в темноту на закаливание (при 2 °С, 7 суток), что свидетельствует об отсутствии разрушения хлорофилла в условиях длительного пребывания растений в темноте при низкой закаливающей температуре.

Увеличение содержания водорастворимых углеводов независимо от типа ткани растений (фотоавто- или гетеротрофная) и способа их накопления (фотосинтез или поглощение из раствора сахарозы) влияло на морозоустойчивость растений озимой пшеницы. Обогащение сахарами в контрольных условиях, хотя и повышало выживаемость растений, но было недостаточным для оптимального повышения морозоустойчивости, которое достигалось при закаливании в условиях низкой положительной температуры. Повышение морозоустойчивости сопровождалось значительным ингибированием роста как этиолированных (рис. 20, 22), так и зеленых растений (рис. 26, 28) и снижением содержания воды в листьях этих растений (рис. 21, 27).

Поскольку в механизмах повышения морозоустойчивости растений важная роль отводится синтезу стрессовых белков, то помимо изучения

изменений содержания сахаров в работе был проанализирован синтез дегидринов. Дегидрины – многофункциональные белки, которые обнаружены в различных компартментах растительной клетки, и их синтез значительно индуцируется действием факторов, приводящих к обезвоживанию [124, 171, 173, 187]. Низкая температура независимо от типа ткани и светового режима закаливания индуцировала синтез как высоко-, так и низкомолекулярных дегидринов (рис. 13, 24, 30). Спектр дегидринов в побегах этиолированных проростков и листьях этиолированных и зеленых растений почти полностью совпадал. Выращивание растений на сахарозе в контрольных условиях индуцировало синтез низкомолекулярных дегидринов как в листьях этиолированных, так и зеленых растений (рис. 24, 30). Поскольку в этих условиях повышалась морозоустойчивость растений (рис. 22, 28), можно говорить о защитной роли индуцированных сахарозой дегидринов. Дегидрины локализуются в различных органеллах, в том числе в митохондриях. Накопление дегидринов происходило в митохондриях пшеницы, ржи и кукурузы под действием низкой температуры [55]. При этом в холодоустойчивых растениях пшеницы и ржи накапливались более термостабильные дегидрины, чем в холодочувствительных растениях кукурузы. Было предположено, что функция дегидринов в этих условиях связана со стабилизацией белков в мембране или в матриксе митохондрий [55]. В паренхиме коры стеблевых тканей проростков озимой пшеницы в контроле все дегидрины митохондрий локализовались исключительно в области наружной и внутренней мембран, в то время как при закаливании их накопление происходило и в матриксе, хотя в абсолютном выражении содержание дегидринов вблизи мембран увеличивалось в 3 раза [32]. В то же время синтез дегидринов в отсутствие значимого накопления сахаров при закаливании к холоду не может обеспечить оптимальную морозоустойчивость, поскольку закаливание зеленых растений в темноте хотя и индуцировало синтез дегидринов, но морозоустойчивость этих растений была ниже, чем при закаливании в темноте на растворе сахарозы

(рис. 28, 29, 30).

Таким образом, накопление водорастворимых углеводов и синтез дегидринов являются механизмами, необходимыми для повышения морозоустойчивости растений как с гетеротрофным, так и фотоавтотрофным типом метаболизма. Поскольку используемые условия закаливания были эффективными для повышения морозоустойчивости, то закаленные таким образом растения использовали для изучения функционирования митохондриальных несопряженных систем дыхания.

4.2. РОЛЬ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ФЕРМЕНТОВ ДЫХАНИЯ В МЕТАБОЛИЗМЕ ГЕТЕРОТРОФНЫХ И ФОТОАВТОТРОФНЫХ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ ПРИ ХОЛОДОВОМ ЗАКАЛИВАНИИ

Дыхательные пути в растительных тканях включают гликолиз, который протекает в цитозоле и пластидах, ПФП, протекающий в пластидах и цитозоле, цикл Кребса в матриксе митохондрий и электрон-транспортные пути, расположенные во внутренней митохондриальной мембране. Ферменты гликолиза, ПФП, ПДК, цикла Кребса и дыхательной цепи митохондрий чувствительны к изменению температуры окружающей среды и по-разному реагируют на ее снижение [35, 67, 84, 102, 127, 129]. У холодоустойчивых растений ферменты дыхательных путей активны в широком диапазоне температур, у них также более устойчивы к действию низких температур фототосинтетические реакции [49]. Транспорт метаболитов у холодоустойчивых растений поддерживается в широком температурном диапазоне и дольше сохраняются донорно-акцепторные взаимодействия [49].

Активность ключевых ферментов, которые контролируют поступление субстратов в митохондрии, таких как ПДК и малик-энзим, может снижаться при низких температурах [129]. Снижение активности ПДК и малик-энзима при низкой температуре зависит от интенсивности освещения: при низкой освещенности дыхание более чувствительно к низкой температуре, чем при оптимальной [129]. Активность ПДК при избыточном освещении ингибируется высокими концентрациями АТФ, НАД·Н и аммонием, которые

образуются в реакциях фотодыхания, это, в свою очередь, может ограничивать поток электронов в цикл Кребса [183]. Вероятно, что в условиях действия низких температур эти изменения будут более выраженными. Известно, что ПФП менее чувствителен к холоду, чем гликолиз, поэтому вклад ПФП в дыхание несколько увеличивается при низких температурах [127]. Низкая температура приводит к торможению транспорта электронов в митохондриях растений через цитохромный путь и активации транспорта электронов через альтернативный путь, связанный с функционированием АО [94, 127]. Нет сомнений, что АО принимает участие в ответной реакции растений на низкую температуру [100, 219]. Активация АП при низкой температуре показана на различных растительных объектах как с гетеротрофным, так и фотоавтотрофным типом питания [57, 94, 152, 168, 194, 208, 223]. Однако функциональная роль АО при действии низких температур на растения остается во многом дискуссионной.

Одним из общих ответов растений на действие низкой температуры является накопление в их тканях водорастворимых углеводов [21, 40, 44]. В связи с этим одна из функций АО и альтернативных НАД(Ф)·Н-ДГ в условиях низких температур может заключаться в рассеивании избытка углеводов, что способствует поддержанию скоростей оборота АТФ. В согласии с этим находятся ранее полученные данные о взаимосвязи углеводного статуса и активности АО. В листьях некоторых видов растений *in vivo* активность АО в митохондриях высока, когда углеводный статус высок (например, листья после освещения) и АО может играть важную роль как энергорассеивающий путь [161]. В зеленых листьях пшеницы показана прямая корреляция между содержанием сахаров в среде инкубации и скоростью дыхания, и вкладом в дыхание АП [68]. Показана зависимость активации дыхания листьев сахарами от освещенности: если добавление экзогенных сахаров в среду инкубации проводили в ночной период, то увеличение дыхания наблюдали, если после освещения – этот эффект отсутствовал [127, 161]. При этом усиление дыхания листьями при

добавлении экзогенных сахаров было чувствительно к ингибитору АО – СГК [127]. В то же время существуют данные об отсутствии связи между активностью АО *in vivo* и углеводным статусом [161, 208]. Такие неоднозначные данные о связи активности АО и углеводного статуса могут быть связаны с экологическими особенностями растений. С использованием мутантных линий растений с измененной экспрессией генов АО была предпринята попытка изучить зависимость углеводного статуса от функционирования АО. На растениях арабидопсиса с отсутствием гена *AOX1a* было показано, что после действия низкой температуры в этих растениях крахмала накапливается больше, чем в растениях дикого типа [225]. Это предполагает, что функционирование АО связано с расходом углеводов. В то же время существуют противоположные результаты. Показано, что растения табака с пониженной экспрессией *AOX1a* накапливали сахаров меньше, чем растения дикого типа, а растения с повышенной экспрессией этого гена при низкой температуре накапливали сахаров больше (глюкозы и фруктозы), чем растения дикого типа [223]. Последние результаты свидетельствуют в пользу того, что функционирование АО способствует накоплению сахаров. Это в свою очередь подразумевает, что АО играет важную роль в поддержании фотосинтетических реакций в стрессовых условиях. Так, была выявлена важная роль АО в защите ЭТЦ хлоропластов от фотоингибирования при избыточном освещении [95, 117, 228, 230]. Было показано, что ингибирование АО приводило к сверхвосстановлению ЭТЦ хлоропластов [229]. На фоне ингибирования АО в листьях пшеницы отмечалось сильное ограничение фотосинтетических реакций при совместном действии засухи и света высокой интенсивности [218]. Снижение эффективности фотосинтеза наблюдали у мутантов арабидопсиса с отсутствием *AOX1a* при действии засухи и света умеренной интенсивности [107], при обработке антимицином А [115]. Показано, что под действием света высокой интенсивности происходит увеличение экспрессии не только гена АО [116], но и генов,

кодирующих «внутренние» и «внешние» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа [97, 100, 199]. Функционирование АО, а также альтернативных НАД(Ф)·Н-ДГ, необходимо для оптимизации фотосинтеза за счет поддержания требуемого уровня АТФ в цитозоле, повышения синтеза сахарозы и рассеивания избытка восстановительных эквивалентов от хлоропластов [229]. Предполагается, что «внутренняя» НАД·Н-ДГ II типа играет важную роль в поддержании фотосинтетического метаболизма процессов фотодыхания [199], а функционирование «внешней» НАДФ·Н-дегидрогеназы, способной окислять цитозольный НАДФ·Н, экспортированный из хлоропластов, вероятно, способствует поддержанию окислительно-восстановительного баланса хлоропластов [100].

Несмотря на большое количество данных, имеющихся в литературе, функционирование АО и НАД(Ф)·Н-ДГ II типа в растительных тканях при действии низких температур до конца не выяснено, также не выяснено как изменение углеводного статуса при холодовом закаливании растений влияет на активность этих систем. В настоящей работе получены результаты, которые свидетельствуют об участии АО и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-ДГ в ответной реакции митохондрий гетеротрофных и фотоавтотрофных тканей озимой пшеницы на низкую температуру и о важной роли данных белков в механизмах морозоустойчивости. Также показано, что изменение углеводного статуса при холодовом закаливании растений регулирует активность альтернативных ферментов дыхания.

С использованием митохондрий, изолированных из побегов этиолированных проростков и листьев этиолированных и зеленых растений озимой пшеницы, после действия на растения низких закаливающих температур показаны изменения в дыхательной активности митохондрий и функционировании АО и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-ДГ. Как известно, митохондрии из фотоавтотрофных и гетеротрофных тканей растений сильно отличаются по составу белков и их содержанию, а также имеют различия в метаболизме, связанные с выбором субстрата для дыхания

и/или его доступностью [130, 144]. На примере проростков арабидопсиса, выращенных на свету, и митохондрий культуры клеток арабидопсиса показано, что большинство отличий митохондриального протеома фотоавто- и гетеротрофных клеток связано с матриксом этих органелл и не затрагивает основные комплексы дыхательной цепи, локализованные во внутренней мембране [130]. Так, основным отличием митохондрий фотосинтезирующих тканей является их способность окислять глицин или формиат, а также высокое содержание компонентов глициндекарбоксилазного комплекса и серингидроксиметилтрансферазы, принимающих участие в фотодыхании [130]. В нефотосинтезирующих тканях окисление дыхательных субстратов молекулярным кислородом является основным источником энергии в клетке. Учитывая имеющиеся данные о различиях метаболизма в клетках гетеротрофных и фотоавтотрофных тканей было предположено, что функционирование несопряженных с синтезом АТФ альтернативной оксидазы и НАД(Ф)-Н-ДГ II типа при действии низких температур будет отличаться. Следует также отметить, что работы по изучению АП в зеленых листьях растений выполнены в основном на интактных тканях, а не на изолированных митохондриях. Это связано со сложностью получения функционально активных митохондрий из зеленых листьев. В настоящей работе все исследования проводились на очищенных в градиенте перколла митохондриях из листьев озимой пшеницы.

Интенсивность митохондриального дыхания растений озимой пшеницы, выращенных в контрольных условиях, зависела от содержания сахаров. Наиболее высокой она была в побегах молодых 3-х суточных проростков (рис. 15), у которых содержание сахаров было наибольшим (рис. 12), и снижалась в листьях этиолированных и зеленых растений (рис. 32, 35, 36), в тканях которых содержание сахаров было гораздо ниже по сравнению с этиолированными проростками (рис. 23, 29). Полученные результаты согласуются с данными, имеющимися в литературе. Так, прослеживается связь между дыханием листьев и их углеводным статусом при деэтиоляции

[9]. Скорости дыхания были выше в молодых развивающихся листьях, в которых содержание сахаров было высоким, и уменьшались в листьях со сформировавшимся фотосинтетическим аппаратом, у которых содержание сахаров было снижено [9, 161]. По мере развития листа изменялся вклад в дыхание ЦП и АП [9].

При анализе скоростей окисления различных субстратов изолированными из гетеротрофных и фотоавтотрофных тканей озимой пшеницы митохондриями были выявлены различия в изменении интенсивности дыхания в ответ на действие низкой температуры. Холодовое закаливание этиолированных проростков и растений в темноте хотя и приводило к снижению скорости дыхания в митохондриях (рис. 15, 32), но это снижение было не таким значительным как снижение, которое наблюдали в митохондриях из зеленых растений, закаленных в темноте (рис. 35, 36). Одним из объяснений полученных результатов является более высокий уровень водорастворимых углеводов в тканях побегов этиолированных проростков и растений по сравнению с зелеными (рис. 12, 23, 29). Действительно, в условиях закаливания зеленых растений озимой пшеницы в темноте на растворе сахарозы или при непрерывном освещении, когда содержание сахаров в тканях было намного выше, чем при закаливании в темноте (рис. 29), снижение интенсивности дыхания либо не наблюдали, либо оно было незначительным (рис. 35, 36). Наши данные согласуются с общими представлениями об изменении интенсивности дыхания при снижении температуры. Снижение интенсивности дыхания в листьях, вероятно, происходит в результате сниженных скоростей поступления углерода в митохондрии и/или увеличенного аденилатного контроля митохондриального электронного транспорта (в связи с сокращенным потреблением АТФ при низких температурах) [129].

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. 15, 32, 36). 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. 32, 36).

С использованием антител против АО *S. guttatum* в митохондриях из побегов этиолированных проростков озимой пшеницы выявлено присутствие двух полипептидов с мол. массами 31 и 32 кД (рис. 16) и одного полипептида с мол. массой 33 кД в митохондриях из листьев этиолированных и зеленых растений озимой пшеницы (рис. 33, 37). С помощью антител против ротенон-нечувствительных «внешних» (NDB) и «внутренних» (NDA) НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ *S. tuberosum* в митохондриях озимой пшеницы нами впервые были идентифицированы белки NDA и NDB [25]. Антитела против NDA *S. tuberosum* детектировали в митохондриях из этиолированных проростков и листьев озимой пшеницы два полипептида с мол. массами 63 и 56 кД, а в митохондриях из зеленых листьев одиночный полипептид с мол. массой 63 кД (рис. 16, 33, 37). Согласно данным литературы NDA представляют собой одиночные полипептиды, мол. масса которых в митохондриях из клубней картофеля (*S. tuberosum*), листьев арабидопсиса (*A. thaliana*) и початков аронника пятнистого (*Arum maculatum*) составляет 48 кД [59, 180], в митохондриях из клубней *H. tuberosus* – 46 кД, в митохондриях из корнеплодов сахарной свеклы (*Beta vulgaris*) – 49 кД [180]. Антитела против NDA *S. tuberosum* не детектировали белки в митохондриях из корней *Ipomea batatas* и колеоптилей *Zea mays* [180]. В дальнейшем при изучении белков NDA выяснилось, что антитела против NDA1 *S. tuberosum* в большей степени реагировали с NDA2 *A. thaliana*, чем с NDA1 *A. thaliana* [196]. Это объясняется высокой степенью идентичности аминокислотных последовательностей NDA1 и NDA2. При получении антител против NDA авторы использовали последовательность NDA1 *S. tuberosum*

D₂₁₅VPGVSEEEKRLLHC₂₃₀ [180]. При сравнении аминокислотных последовательностей NDA1 *S. tuberosum* D₂₁₅VPGVSEEEKRLLHC₂₃₀ и NDA1 *A. thaliana* E₂₁₅VPGIGEDEKKRLLHC₂₃₀ выявлена 68,8% идентичность аминокислотных последовательностей, а при сравнении NDA1 *S. tuberosum* с NDA2 *A. thaliana* D₂₁₅TPGISKEEKRRLLHC₂₃₀ – 81,3% идентичность. Учитывая этот факт, можно предполагать, что детектируемые в митохондриях из этиолированных тканей озимой пшеницы два полипептида с мол. массами 63 и 56 кД представляют собой разные белки NDA, а именно NDA1 и NDA2 (рис. 16, 33). В то же время одиночный полипептид с мол. массой 63 кД, выявляемый в зеленых листьях озимой пшеницы, вероятно, является белком NDA1.

Антитела против NDB *S. tuberosum* [180] выявили в митохондриях озимой пшеницы (независимо от типа ткани – гетеро- или фотоавтотрофная) один полипептид с мол. массой 64 кД (рис. 16, 33, 37). С использованием этих антител в митохондриях других растений (*H. tuberosus*, *I. batatas*, *Z. mays*, *S. tuberosum*) ранее был обнаружен также один полипептид с мол. массой 61 кД [180]. У арабидопсиса существует четыре гена, кодирующих гомологичные белки «внешних» НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ – NDB1, NDB2, NDB3 и NDB4 [59, 179]. Для получения антител против NDB была использована аминокислотная последовательность D₅₆₃WVRRYIFGRDSSRI₅₇₇ NDB1 *S. tuberosum* [180]. Сравнение этой аминокислотной последовательности с аминокислотными последовательностями NDB1 *A. thaliana* D₅₆₃WTRRYIFGRDSSRI₅₇₇ и NDB2 *A. thaliana* D₅₆₃WMRRFIFGRDSSSI₅₇₇ выявило их идентичность на 93,3% и 80%, соответственно, а сравнение с аминокислотными последовательностями *A. thaliana* NDB3 D₅₆₃WMRRFIFGRDSSRI₅₇₇ и NDB4 D₅₆₃WTRRFVIFGRDSSSI₅₇₇ – на 86,7% и 73,3%, соответственно. Учитывая высокую идентичность аминокислотной последовательности NDB1 картофеля, на которую были получены антитела, и аминокислотные последовательности других NDB белков, используемые в настоящей работе

антитела следует рассматривать как общие к белкам семейства NDB. Выравнивание и анализ идентичности аминокислотных последовательностей NDA и NDB осуществляли с помощью ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

Функциональная роль АО и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-ДГ в растительных тканях при низкой температуре, вероятно, состоит в рассеивании излишка субстратов, регуляции образования АФК, регуляции соотношения $[\text{НАД(Ф)·Н}/\text{НАД(Ф)}^+]$ и поддержании работы ферментов гликолиза, цикла Кребса и ПФП, термогенезе. В фотоавтотрофных тканях помимо вышеперечисленных функций АО и ротенон-нечувствительные НАД(Ф)·Н-дегидрогеназы могут участвовать в поддержании фотосинтетических реакций при действии низких температур и благоприятствовать накоплению сахаров. Поскольку ротенон-нечувствительные НАД(Ф)·Н-дегидрогеназы являются флавопротеинами, то они могут быть потенциальными сайтами генерации АФК наряду с комплексом I дыхательной цепи митохондрий [100]. Снижение экспрессии и активности «внутренних» ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ при холодовом стрессе может быть вызвано необходимостью снизить генерацию АФК дыхательной цепью в этих условиях [198]. Предполагается, что участвуя в генерации супероксид анион-радикала, «внешние» НАД(Ф)·Н-дегидрогеназы могут способствовать деградации NO в митохондриях [163]. В отличие от НАД(Ф)·Н-ДГ II типа АО выполняет антиоксидантную роль в растительных клетках [30, 108, 114, 115, 142, 174, 176]. Антиоксидантная функция АО может реализовываться как в гетеротрофных [30, 142], так и в фотоавтотрофных тканях растений [108, 114, 115, 176]. Функционируя в кооперации с альтернативной оксидазой, NDA2 и NDB2 образуют дыхательную цепь, способную окислять цитозольный или матриксный НАД(Ф)·Н, что может быть жизненно необходимо в ситуациях высокого соотношения $[\text{НАД(Ф)·Н}]/[\text{НАД(Ф)}^+]$ [59], а также в условиях ингибирования комплекса I [86]. Повышение соотношения $[\text{НАД·Н}/\text{НАД}^+]$ в

матриксe может приводить к ингибированию НАД⁺-зависимых дегидрогеназ цикла Кребса и торможению работы цикла [169]. Показано, что активация несопряженных путей электронного транспорта на свету предотвращает истощение АДФ и НАД(Ф)⁺, которые необходимы для оборота метаболических циклов [113]. Высокая активность «внутренней» ротенон-нечувствительной НАД·Н-ДГ была обнаружена в митохондриях растущего корнеплода сахарной свеклы, что, по мнению авторов, связано с участием этого фермента в регуляции соотношения [НАД·Н/НАД⁺] в матриксe и его тесной взаимосвязи с функционированием малик-энзима [54].

Митохондрии из побегов этиолированных проростков проявляли высокую активность АО при окислении малата и сукцината по сравнению с окислением НАД·Н и НАДФ·Н (рис. 15). Вероятно, это связано с тем, что при окислении малата или сукцината образуется пируват, который, как известно, является активатором АО [90, 128, 146, 188, 221]. Образование пирувата в митохондриях этиолированных проростков пшеницы при окислении малата [72] указывает на ведущую роль НАД⁺-зависимого малик-энзима в метаболизме малата в этиолированных тканях пшеницы. Участие АО в дыхании митохондрий из листьев этиолированных и зеленых растений при окислении малата и сукцината было менее выражено по сравнению с ее участием в дыхании митохондрий из побегов этиолированных проростков (рис. 15, 32, 35), что может быть связано с более высоким содержанием сахаров в тканях проростков (рис. 12, 23, 29).

Скорость окисления митохондриями озимой пшеницы экзогенного НАД·Н всегда была выше, чем скорость окисления НАДФ·Н, независимо от типа ткани (фотоавто- или гетеротрофная), а участие АО в дыхании митохондрий, окисляющих НАД·Н и НАДФ·Н, было менее выражено по сравнению с ее участием при окислении малата и сукцината (рис. 15, 32, 35, 36). В митохондриях из побегов этиолированных проростков вклад АО в дыхание при окислении НАД·Н и НАДФ·Н составлял не более 14% от общего дыхания (рис. 15) и повышался до 19-20% в митохондриях из

этиолированных листьев (рис. 32) и до 23-25% в митохондриях из зеленых листьев (рис. 36). Большой вклад АО в дыхание при окислении НАД(Ф)-Н митохондриями зеленых листьев указывает на важную роль АО и «внешних» НАД(Ф)-Н-ДГ в энергетическом метаболизме фотосинтезирующих клеток.

Обращает на себя внимание высокая скорость ротенон-нечувствительного дыхания митохондрий озимой пшеницы при окислении малата, которое в побегах этиолированных проростков и листьях этиолированных растений составляло около 61% (рис. 15, 32). В митохондриях из зеленых листьев в контрольных условиях окисление малата было почти полностью ротенон-нечувствительным (только 19% дыхания ингибировалось ротеноном) (рис. 35). Эти данные указывают на высокую активность «внутренних» НАД(Ф)-Н-ДГ II типа в митохондриях озимой пшеницы, особенно в фотосинтезирующих тканях. С функционированием «внутренних» НАД(Ф)-Н-ДГ II типа в митохондриях озимой пшеницы в контрольных условиях выращивания была сопряжена активность АО, вклад которой в данных условиях составил 32-39%, независимо от типа ткани (рис. 15, 32, 35). Высокое ротенон-нечувствительное дыхание (высокая активность «внутренних» ротенон-нечувствительных НАД(Ф)-Н-ДГ) при окислении малата митохондриями из побегов этиолированных проростков, листьев этиолированных и зеленых растений озимой пшеницы может быть опосредовано высокой активностью малик-энзима. Действительно, окисление малата в митохондриях озимой пшеницы преимущественно связано с работой малик-энзима [72]. На митохондриях растущего корнеплода сахарной свеклы показано, что высокая активность малик-энзима [52] коррелирует с высокой скоростью ротенон-нечувствительного окисления малата [54].

Еще одной отличительной особенностью митохондрий из зеленых листьев по сравнению с митохондриями этиолированных тканей является их способность окислять глицин (рис. 15, 32, 35), что как было выше сказано, связано с наличием в митохондриях фотосинтезирующих тканей

глициндекарбоксилазного комплекса [130]. При окислении глицина цианид-резистентное дыхание было менее выражено (около 16% от общего дыхания митохондрий) по сравнению с другими субстратами (рис. 35, 36).

Действие низких закаливающих температур влияло на функционирование АО и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ в митохондриях озимой пшеницы. При закаливании к холоду содержание АО и NDB в митохондриях из этиолированных проростков увеличивалось (рис. 16). Наряду с усилением синтеза белка наблюдали увеличение вклада в дыхание АО (рис. 15). Показано, что увеличение вклада АО в дыхание при закаливании проростков происходит при окислении митохондриями сукцината и НАД·Н (рис. 15). Эти данные свидетельствуют о регуляции активности АО в проростках озимой пшеницы при холодовом закаливании на транскрипционном и постраскрипционном уровнях.

В условиях низкотемпературной адаптации АО может выполнять антиоксидантную роль, что выявлено нами при изучении содержания АФК в митохондриях озимой пшеницы в присутствии ингибиторов дыхательной цепи (рис. 18б). Инкубация митохондрий из закаленных проростков с ингибитором АО – БГК приводила к большей, чем в митохондриях из контрольных проростков, генерации АФК, в то время как антимицин А в митохондриях из закаленных проростков не усиливал генерацию АФК по сравнению с митохондриями контрольных проростков [2]. Индукция АФК под действием ингибитора комплекса III ЭТЦ – антимицина А и ингибиторов АО – гидроксамовых кислот была показана ранее на различных растительных объектах [30, 108, 114, 115, 142, 174, 176]. Обработка СГК приводила к увеличению внутриклеточных АФК в листьях пшеницы [108], в протопластах мезофилла гороха [114] и в митохондриях гороха [30]. Антимицин А усиливал генерацию АФК в протопластах мезофилла гороха [114], в митохондриях гороха [30], в суспензионной культуре клеток арабидопсиса [142], в митохондриях перца [176]. В культуре клеток арабидопсиса с повышенной или сниженной экспрессией *AOX1a* с

применением антимицина А была доказана антиоксидантная роль АО [142]. Обработка антимицином А мутантов арабидопсиса с выключенной экспрессией *AOX1a* приводила к увеличению образования АФК, что сопровождалось ингибированием фотосинтеза, повреждением мембран и некрозом [115]. В то время как в контрольных условиях антиоксидантная роль АО подтверждена многочисленными работами, то ее роль остается мало доказанной в условиях действия на растения низких температур. Показано, что перенос гена *WAOX1a* пшеницы в растения арабидопсиса, сопровождающийся увеличением АП, приводил к снижению генерации АФК в листьях при низкой температуре [168], что предполагает возможную антиоксидантную функцию АО в этих условиях. В настоящей работе впервые показано, что в изолированных из закаленных проростков озимой пшеницы митохондриях, в которых вклад АО в дыхание (рис. 15) и содержание белка АО (рис. 16) выше по сравнению с митохондриями из контрольных проростков, меньше генерируется АФК в присутствии антимицина А, а также более существенно возрастает генерация АФК при добавлении БГК (рис. 18). Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о важной роли АО в антиокислительной защите растительных клеток при закаливании к холоду.

Окисление НАД·Н митохондриями из этиолированных проростков озимой пшеницы в меньшей мере зависит от действия низкой температуры, чем окисление НАДФ·Н (рис. 15). На основании этих данных можно предполагать, что «внешняя» НАД·Н-ДГ II типа, но не «внешняя» НАДФ·Н-ДГ II, играет важную роль в поддержании функционального состояния митохондрий в гетеротрофных тканях растений при действии низких температур [25]. Подобное предположение ранее высказывалось и другими авторами [103, 170, 232]. 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, «внешних» и «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа (рис. 35, 36). Активность АО повышалась и при окислении малата в присутствии ротенона (в условиях когда функционируют «внутренние» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа) в митохондриях из зеленых растений после их закаливания в темноте на растворе сахарозы и при закаливании в условиях непрерывного освещения (рис. 35). Однако такого увеличения активности АО после закаливания растений в темноте на растворе сахарозы не наблюдали в митохондриях из этиолированных листьев (рис. 32). В митохондриях этиолированных листьев после закаливания на растворе сахарозы содержание АО и полипептида NDA с мол. массой 56 кД увеличивалось, а содержание NDB и полипептида NDA с мол. массой 63 кД снижалось (рис. 33). При закаливании в темноте на растворе сахарозы в митохондриях зеленых листьев наблюдали увеличение содержания белка АО и NDB, в то время как содержание NDA не изменялось (рис. 37). Увеличение содержания белка АО в митохондриях озимой пшеницы после закаливания на растворе сахарозы независимо от типа ткани указывает на сахарозависимую регуляцию экспрессии генов, кодирующих АО.

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. 29) и активация АО при окислении малата, малата в присутствии ротенона, глицина и экзогенного НАД·Н (рис. 35, 36). Активность «внешних» и «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ при этом

поддерживалась на высоком уровне (рис. 35, 36). Таких изменений не наблюдали при закаливании зеленых растений в темноте и при 16 ч фотопериоде (рис. 35, 36). 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.

Одной из функций АО и НАД(Ф)·Н-ДГ II типа при действии на растения низких температур может быть термогенез. Участие АО и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-ДГ в термогенезе в основном изучается на термогенных растениях. Термогенная функция АО убедительно показана в растениях семейств ароидные, лотосовые и др. [182, 226]. Предполагается, что высокая активность АО в сочетании с высокой активностью несопряженных НАД·Н-дегидрогеназ, окисляющих внутримитохондриальный и цитоплазматический пулы НАД·Н, является основным механизмом термогенеза у термогенных растений [3]. Митохондрии из соцветий термогенных растений (*Arum orientale*) имеют высокую активность «внутренней» и «внешней» ротенон-нечувствительных НАД·Н-дегидрогеназ и наряду с этим высокую активность АО [3], что позволяет реализовать механизм прямого превращения энергии в тепло. В гетеротрофных тканях нетермогенных растений (озимые злаки) при низкотемпературном стрессе происходит повышение температуры ткани, которое является чувствительным к ингибиторам АО [6, 212]. Можно предполагать, что термогенез у озимой пшеницы посредством АО и «внутренних» и «внешних» НАД(Ф)·Н-ДГ является одним из механизмов защиты растений при кратковременном снижении температуры окружающей среды, что возможно при высоком содержании сахаров в тканях фотоавто- и гетеротрофных растений.

При низкой температуре АО и «внешние» НАД(Ф)·Н-ДГ, вероятно, могут выполнять важную роль в поддержании фотосинтетической

активности как на свету, так и в темноте. Известно, что при временной инактивации фотосинтетической активности (когда зеленые растения помещаются в темноту) происходит усиление дыхательного метаболизма в клетках листа, что компенсирует дефицит CO_2 , НАДФ·Н, АТФ и продуктов обмена. Усиление дыхательного метаболизма приводит к стабилизации первичных фотохимических реакций, локализованных в хлоропластах, а также стимулирует карбоксилирующую активность Рубиско [35]. Стабилизация фотодыхательного потока при переносе растений из темноты на свет происходит при высоком соотношении $[\text{НАД}\cdot\text{Н}/\text{НАД}^+]$ и $[\text{АТФ}/\text{АДФ}]$ [183]. Поддержание быстрой скорости транспорта электронов в митохондриях на свету облегчается импортом оксалоацетата из цитозоля для переноса НАД·Н и экспортом цитрата в цитозоль. Это уменьшает поток метаболитов в цикл Кребса, снижая скорости декарбоксилирования, в то же время скорость поглощения O_2 остается высокой [183]. В темноте дыхание снабжает клетку АТФ и интермедиатами, необходимыми для роста, транспорта и ассимиляции питательных веществ. Однако на свету АТФ и восстановительные эквиваленты образуются в хлоропластах за счет фотосинтеза, и они используются для ассимиляции углерода.

Кроме образования АТФ для клеточных процессов и окисления избытка восстановительных эквивалентов от хлоропластов, митохондрии на свету участвуют в образовании углеродного скелета для обеспечения биосинтетических реакций. Во время освещения цикл Кребса частично работает, митохондрии используют оксалоацетат, который поступает из цитозоля через оксалоацетатный транслокатор [161]. Оксалоацетат преобразуется в цитрат в цикле Кребса, а затем экспортируется в цитозоль, где преобразуется до 2-оксоглутарата, который является основным источником углеродного скелета для синтеза аминокислот [109]. В условиях низкой необходимости АТФ, рециклинг АДФ может ограничивать скорость окисления через цитохромный путь дыхания [161]. В условиях, когда основная дыхательная цепь чем-то ограничена, происходит ограничение

работы цикла Кребса и др. В этом случае функционирование АО и НАД(Ф)·Н-ДГ II типа может способствовать более быстрому окислению НАД(Ф)·Н, поддерживая работу НАД(Ф)⁺-зависимых ферментов и процессов, обеспечивая потребности клетки в интермедиатах, необходимых для биосинтетических процессов во время холодового закаливания.

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 [НАД(Ф)·Н/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 листьев 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

Регуляция активности АО и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-ДГ в растительных клетках может осуществляться на транскрипционном и постраницном уровнях [24, 100, 219]. Активность АО зависит от уровня доступности субстратов дыхания, от уровня восстановленности убихинолового пула, содержания самого белка, окислительно-восстановительного статуса регулируемой дисульфид/сульфгидрильной области цистеина, вовлеченного в активацию самого фермента, и концентрации α -кетокислот, в частности пирувата [100, 219]. Функционирование АО также зависит от концентрации Ca^{2+} , АФК и стрессовых гормонов [24, 77, 107, 219]. Активность «внешних» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа зависит от концентрации Ca^{2+} , полиаминов, значения pH и

концентрации субстратов [106, 178]. «Внутренняя» НАД·Н-ДГ II типа активируется при повышении концентрации НАД·Н в матриксе и ограничении работы комплекса I ЭТЦ [100]. Ее активность регулируется активностью НАД⁺-зависимых ферментов и выше при функционировании малик-энзима и глициндекарбоксилазы [100]. «Внутренняя» НАДФ·Н-ДГ регулируется концентрацией НАДФ·Н в матриксе и, вероятно, Ca²⁺ [100]. Механизмы регуляции АО и НАД(Ф)·Н-ДГ II типа в растительных клетках в условиях действия низких температур мало изучены. Особый интерес вызывают температуры холодого закаливания, действие которых приводит к повышению холодо- и морозоустойчивости клеток. У озимых злаков это низкие положительные температуры +5-0 °С [44], характерные для первого этапа холодого закаливания. Действие закаливающих температур сопровождается изменениями углеводного статуса растений, который в свою очередь зависит от условий освещенности, а изменение углеводного статуса определяет развитие морозоустойчивости. Углеводный статус также зависит от типа растительной ткани (фотоавто- или гетеротрофная). Как изменение углеводного статуса при холодом закаливании растений с фотоавто- или гетеротрофным типом питания влияет на функционирование АО и НАД(Ф)·Н-ДГ II типа в митохондриях и каким образом происходит регуляция активности данных белков в фотосинтезирующих тканях при изменении условий освещенности в период закаливания, не выяснено.

В диссертационной работе изучена возможность регуляции АО и НАД(Ф)·Н-ДГ II типа в митохондриях озимой пшеницы углеводным статусом растений, низкой температурой и условиями освещенности. Полученные результаты позволили выявить зависимость функционирования АО и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-ДГ от содержания сахаров. Это стало возможным благодаря использованию этиолированных проростков и этиолированных и зеленых растений озимой пшеницы, которые в контрольных условиях имели различное содержание сахаров (рис. 12, 23, 29).

Содержание водорастворимых углеводов в побегах этиолированных проростков по сравнению с листьями этиолированных и зеленых растений было значительно больше (25,1% по сравнению с 5,3% и 2,4%) и соответственно был больше вклад АО в дыхание митохондрий из побегов при окислении малата и сукцината (рис. 15, 32, 35). Скорость окисления НАД·Н и НАДФ·Н также была выше в митохондриях из побегов проростков (рис. 15). На основании этих данных возникло предположение о связи между содержанием сахаров в тканях и активностью АО и «внешних» НАД(Ф)·Н-ДГ в митохондриях. В дальнейшем оказалось, что вклад АО в дыхание митохондрий из побегов проростков, окисляющих НАД·Н и НАДФ·Н, был ниже по сравнению с вкладом АО в дыхание митохондрий при окислении сукцината и малата (рис. 15). Считается, что высокая доступность субстрата для цианид-резистентного дыхания при низкой скорости его окисления является механизмом обхода менее активной дегидрогеназой другой – более активной [1]. Такой механизм характерен для митохондрий из проростков, а в случае митохондрий из листьев, по-видимому, задействованы другие пути регуляции потока электронов от различных дегидрогеназ на ЦП или АП. Скорость ротенон-нечувствительного окисления малата была высокой в этиолированных растениях (рис. 15, 32) и еще выше в зеленых (рис. 35). Такая высокая скорость ротенон-нечувствительного окисления малата свидетельствует о важной физиологической роли «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа в энергетическом метаболизме митохондрий озимой пшеницы, особенно в фотосинтезирующих тканях.

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, а также закаливание в присутствии сахарозы и при различном световом режиме. Применение сахарозы для обогащения растений водорастворимыми углеводами позволяет увеличивать морозоустойчивость озимой пшеницы [44]. При выращивании

этиолированных и зеленых растений озимой пшеницы на растворе сахарозы происходил рост морозоустойчивости растений и значительная активация АО при окислении всех используемых субстратов, за исключением глицина и малата в присутствии ротенона (рис. 32, 35, 36). В этих условиях выращивания отмечено и повышение активности «внешних» и «внутренних» ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-ДГ независимо от типа ткани (рис. 32, 35, 36). При этом функционирование «внешних» НАД·Н и НАДФ·Н-ДГ было сопряжено с повышенной активностью АО (рис. 32, 36). Полученные данные позволяют сделать заключение о сахаро-зависимой регуляции активности изучаемых систем. Из литературы известно о связи между активностью АО в интактных тканях и содержанием водорастворимых углеводов [68]. 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 [100, 106, 178, 219]. Помимо регуляции активности альтернативных ферментов дыхания субстратами дыхания, существуют данные о сахаро-зависимой регуляции генов этих ферментов. Так, обработка растений арабидопсиса сахарозой и глюкозой приводила к активации генов *NDB2*, *AOX1a*, кодирующих «внешнюю» НАД·Н-ДГ и альтернативную оксидазу, соответственно [77].

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 растворе сахарозы приводило к увеличению вклада АО в дыхание при окислении практически всех изученных субстратов (рис. 32, 35, 36). 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. 32, 36). В отличие от «внешних» НАД(Ф)·Н-ДГ, функционирование «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ зависело от типа ткани: в митохондриях из этиолированных листьев их активность не изменялась, а в

митохондриях из зеленых листьев увеличивалась (рис. 32, 35). 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. 35, 36). В митохондриях из этиолированных листьев повышенный вклад АП в дыхание наблюдали только при функционировании «внешних» НАД(Ф)·Н-ДГ (рис. 32). У озимой пшеницы обработка сахарозой при действии низкой температуры сопровождалась повышением содержания белка АО в митохондриях (рис. 16, 33, 37). Ранее было показано увеличение транскриптов *WAOX1a* и *WAOX1c*, кодирующих АО у озимой пшеницы, при холодовом закаливании [79, 152]. В проростках озимой пшеницы нами было показано увеличение экспрессии *WAOX1c* и увеличение содержание белка АО при холодовом закаливании [25]. Одновременно с увеличением содержания АО в митохондриях озимой пшеницы происходило увеличение содержания NDB [25]. Поскольку при низких температурах происходит увеличение содержания не только водорастворимых углеводов [40, 44], но и АФК, АБК и Ca^{2+} [87, 156, 197] не исключена возможность участия этих агентов в регуляции активности АО и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-ДГ при низкой температуре. АФК выполняют сигнальную функцию в условиях действия низких температур на растения [81, 166, 197, 200, 222]. Известно, что супероксид радикал-анион вовлечен в процесс митохондриальной ретроградной регуляции, активируя *AOX1a* при низкотемпературном воздействии [166]. Содержание АФК в митохондриях этиолированных проростков озимой пшеницы возрастало после холодового закаливания (рис. 17). Некоторое повышение уровня АФК в митохондриях озимой пшеницы при низкой температуре возможно является сигналом для активации генов АО. В регуляции активности альтернативных НАД(Ф)·Н-ДГ II типа и АО при низкой температуре могут принимать участие ионы кальция. Действие низкой температуры сопровождается повышением содержания уровня свободного Ca^{2+} в цитозоле [81, 156], который может транспортироваться в митохондрии [31].

Увеличение концентрации Ca^{2+} в митохондриях может оказывать влияние на дыхательную активность митохондрий [136], в том числе на активность альтернативных НАД(Ф)·Н-ДГ II типа и АО.

Известно, что экспрессия генов *NDA1* и *NDC1* и *AOX1a* имеет светозависимую регуляцию [77, 134]. АО может активироваться светом через фитохромы, фототропины и криптохромы [228]. Как влияет световой режим во время холодового закаливания на активность АО и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-ДГ в митохондриях растений, ранее не изучалось. Нами показано, что в контрольных условиях функционирование «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ в митохондриях озимой пшеницы зависит от света – в зеленых листьях окисление малата осуществляется почти полностью через «внутренние» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа (рис. 36). Во время закаливания световой режим определяет функционирование АО и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-ДГ (рис. 35, 36). Использование различных фотопериодов (0, 16 и 24 ч фотопериоды) при закаливании позволило оценить связь между содержанием сахаров и активностью альтернативных ферментов дыхания, поскольку от светового режима зависит интенсивность фотосинтеза и накопление сахаров. Чем меньше была длительность освещения во время закаливания, тем меньше накапливалось сахаров в листьях (рис. 29), ниже была скорость окисления субстратов дыхания, в том числе малата в присутствии ротенона и экзогенных НАД·Н и НАДФ·Н (рис. 35, 36) и ниже был вклад АО в дыхание (рис. 35, 36).

Высокая концентрация АТФ и НАД·Н на свету ограничивает поток электронов в цикл Кребса [183], 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. 35, 36). 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, при этом только 25-50% НАД·Н экспортируется, а основная часть окисляется в митохондриях [125]. Образование НАДФ·Н в митохондриях может быть достигнуто через трансгидратацию между НАД·Н и НАДФ⁺ [75]. Увеличенный уровень НАДФ·Н может приводить к активации АО (вероятно, через систему глутатиона и тиоредоксина) [161, 183] и «внутренней» НАДФ·Н-ДГ, которая вовлечена в окисление глицина наряду с комплексом I дыхательной цепи [74, 75]. «Внутренние» 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. 35). Закаливание зеленых растений в условиях непрерывного освещения сопровождалось увеличением активности АО при окислении всех субстратов дыхания, за исключением НАДФ·Н (рис. 35, 36). Функционирование «внешних» и «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ в митохондриях не изменялось в этих условиях закаливания, однако при функционировании «внутренних» НАД(Ф)·Н-ДГ II типа и «внешней» НАД·Н-ДГ отмечалось повышение активности АО (рис. 35, 36).

Совокупность полученных результатов указывает на то, что свет играет важную роль в регуляции активности альтернативной оксидазы 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 АО при холодовом закаливании в условиях доступности субстратов дыхания регулируется световым режимом. При холодовом закаливании в темноте на растворе сахарозы как этиолированных, так и зеленых листьев транспорт электронов от «внешней» НАДФ·Н-ДГ осуществляется через АО, 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. 36). 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. Полученные в работе результаты о связи морозоустойчивости озимой пшеницы с активностью альтернативной

оксидазы и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-ДГ расширяют представления о механизмах адаптации растений к действию неблагоприятных низких температур.

Ведущим фактором, ограничивающим возделывание озимой пшеницы в условиях резко континентального климата, является ее гибель в зимне-весенний период [15]. В связи с этим перспективы дальнейших исследований видятся в изучении роли митохондрий и альтернативных ферментов дыхания в период выхода растений из закаленного состояния. Также требует более пристального внимания изучение механизмов взаимодействия путей, регулирующих активность альтернативных ферментов дыхания, с сигнальными путями в растительной клетке.

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 закаливание) 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.

ЛИТЕРАТУРА

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 // Физ. раст. – 1998. – Т. 45, № 2. – С. 253–261.
2. Антиоксидантная функция альтернативной оксидазы в митохондриях озимой пшеницы при холодовом закаливании / О.И. Грабельных [и др.] // Биол. мембраны. – 2011. – Т. 28, № 4. – С. 274–283.
3. Берцова Ю.В. Окисление NADH митохондриями термогенного растения *Arum orientale* / Ю.В. Берцова, В.Н. Попов, А.В. Богачев // Биохимия. – 2004. – Т. 69, № 5. – С. 712–718.
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. Верещагин А.Г. Липиды в жизни растений / А.Г. Верещагин. – М.: Наука, 2007. – 73 с.
6. Влияние различных термогенных систем митохондрий на температуру проростков озимой пшеницы во время холодового шока / В.К. Войников [и др.] // Доклады РАН. – 2001. – Т. 378, № 5. – С. 700–702.
7. Влияние углеводного статуса и низкой температуры на дыхательный метаболизм митохондрий из этиолированных листьев озимой пшеницы / О.А. Боровик [и др.] // Журнал стресс-физиологии и биохимии. – 2014. – Т. 10, № 4. – С. 118–130.
8. Влияние холодового шока на жирнокислотный состав и функциональное состояние митохондрий закаленных и незакаленных проростков озимой пшеницы / О.И. Грабельных [и др.] // Биол. мембраны. – 2014. – Т. 31, № 3. – С. 204–217.

9. Гармаш Е.В. Активность дыхательных путей и фонд неструктурных углеводов в листе зеленеющих проростков яровой пшеницы / Е.В. Гармаш, Р.В. Малышев, М.А. Шелякин, Т.К. Головки // Физ. раст. – 2014. – Т.61, № 2. – С. 177–186.
10. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц; пер с англ. – М. : Практика, 1998. – 459 с.
11. Головки Т.К. Дыхание растений (физиологические аспекты) / Т.К. Головки. – СПб. : Наука, 1999. – 204 с.
12. Джавадиан Н. Вызванные холодом изменения активности ферментов и содержания пролина, углеводов и хлорофиллов у пшеницы / Н. Джавадиан, Г. Каримзаде, С. Мафузи, Ф. Ганати // Физ. раст. – 2010. –Т. 57, № 4. – С. 580–588.
13. Джеймс В. Дыхание растений / В. Джеймс. – М. : Изд-во иностранной литературы, 1956. – 440 с.
14. Дише З. В кн. Метод химии углеводов / З. Дише. – М. : Мир, 1967. – С. 21–24.
15. Дорофеев Н.В. Озимая пшеница в Иркутской области / Н.В. Дорофеев, А.А. Пешкова, В.К. Войников / отв. ред. О.П. Родченко. – Иркутск : Арт-Пресс, 2004. – 175 с.
16. Иванов В.Б. Клеточные основы роста растений / В.Б. Иванов. – М. : Наука, 1974. – 223 с.
17. Касперска-Палач А. Механизм закаливания травянистых растений / А. Касперска-Палач // Холодостойкость растений / отв. ред. Г.А. Самыгин. – М. : Колос, 1983. – С. 112–123.
18. 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 // Физ. раст. – 1995. – Т. 42, № 4. – С. 603–606.

19. Климов С.В. Повышенное соотношение фотосинтез/дыхание при низких температурах – важное условие холодового закаливания озимой пшеницы / С.В. Климов // Физ. раст. – 1998. – Т. 45, № 3. – С. 419–424.
20. Колесниченко А.В. Белки низкотемпературного стресса растений / А.В. Колесниченко и В.К. Войников / отв. ред. В.К. Войников. – Иркутск : Арт-Пресс, 2003. – 196 с.
21. Кошкин Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур : Учебник / Е.И. Кошкин. – М. : Дрофа, 2010. – 638 с.
22. Ланг Т.А. Как описывать статистику в медицине. Аннотированное руководство для авторов, редакторов и рецензентов / Т.А. Ланг и М. Сесик; пер. с англ. под ред. В.П. Леонова. – М. : Практическая медицина, 2011. – 480 с.
23. Медведев С.С. Физиология растений / С.С. Медведев. – Спб.: БХВ-Петербург, 2013. – 512 с.
24. 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.
25. Митохондриальные энергорассеивающие системы (альтернативная оксидаза, разобщающие белки и «внешняя» NADH-дегидрогеназа) вовлечены в развитие морозоустойчивости проростков озимой пшеницы / О.И. Грабельных [и др.] // Биохимия. – 2014.– Т. 79, вып. 6. – С. 647–662.
26. Нарийчук Ф.Д. Изменение функциональной активности митохондрий проростков озимой пшеницы в процессе закаливания / Ф.Д. Нарийчук и В.И. Бабенко // Физ. и биох. культ. растений. – 1981. – Т. 13, № 6. – С. 582–586.
27. Нельсон Д. Основы биохимии Ленинджера : в 3 т. Т. 1 / Д. Нельсон и М. Кокс ; пер. с англ. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 694 с.

28. Побежимова Т.П. Методы изучения митохондрий растений. Полярография и электрофорез / Т.П. Побежимова, А.В. Колесниченко, О.И. Грабельных. – М. : ООО «НПК Промэкспобезопасность», 2004. – 98 с.
29. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода: Учебное пособие / О.Г. Полесская. – М. : Издательство «КДУ», 2007. – 140 с.
30. Попов В.Н. Влияние ингибиторов электронного транспорта на образование активных форм кислорода при окислении сукцината митохондриями гороха / В.Н. Попов, Э.К. Рууге, А.А. Старков // Биохимия. – 2003. – Т. 68, № 7. – С. 910–916.
31. Рихванов Е.Г. Митохондрия как критическое звено в ответе растительной и дрожжевой клетки на тепловое воздействие : автореф. дис. ... доктора биол. наук : 03.01.05 / Е.Г. Рихванов. – Иркутск, 2012. – 43 с.
32. Романенко А.С. Субклеточная локализация дегидринов в проростках растений озимой пшеницы при низкотемпературной адаптации / А.С. Романенко, Г.Б. Боровский, И.В. Уколова, Л.А. Ломоватская // Биол. мембраны. – 2010. – Т. 27, № 2. – С. 156–165.
33. Самыгин Г.А. Быстрое определение относительной морозостойкости образцов пшеницы путем промораживания проросших семян / Г.А. Самыгин // Методы определения морозостойкости растений. – М. : Наука, 1967. – С. 77–84.
34. Связь между активностью альтернативного пути дыхания, содержанием сахаров и морозоустойчивостью озимой пшеницы / О.А. Боровик [и др.] // Журнал стресс-физиологии и биохимии. – 2013. – Т. 9, № 4. – С. 241–250.
35. Семихатова О.А. Физиология дыхания растений / О.А. Семихатова и Т.В. Чиркова. СПб.: Изд-во С.Петербург. ун-та, 2001. – 224 с.
36. Скабкин М.А. Мультифункциональные белки с доменом холодового шока в регуляции экспрессии генов / М.А. Скабкин, О.В. Скабкина, Л.П. Овчинников // Успехи биол. хим. – 2004. – Т. 44. – С. 3–52.

37. Софронова В.Е. Фотозащитные механизмы в фотосистеме II *Erythra monosperma* в период формирования морозоустойчивого состояния / В.Е. Софронова, Т.К. Антал, О.В. Дымова, Т.К. Головки // Физ. раст. – 2014. – Т.61, № 6. – С. 798–807.
38. Структурно-функциональная реорганизация фотосинтетического аппарата растений пшеницы при холодной адаптации / Ю.В. Венжик [и др.] // Цитология. – 2012. – Т. 54, № 12. – С. 916–924.
39. Таланова В.В. Особенности экспрессии АБК-зависимых и АБК-независимых генов при холодной адаптации растений пшеницы / В.В. Таланова, А.Ф. Титов, Л.В. Топчиева, Н.С. Репкина // Физ. раст. – 2011. – Т. 58, № 6. – С. 859–865.
40. Трунова Т.И. Растение и низкотемпературный стресс / Т.И. Трунова. – М. : Наука, 2007. – 54 с.
41. Трунова Т.И. Сахара как один из факторов, повышающих морозоустойчивость растений / Т.И. Трунова // Известия Академии наук СССР. Серия биологическая. – 1972. – № 2. – С. 185–196.
42. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета *Statistica* / Н.В. Трухачева. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 384 с.
43. Туманов И.И. Влияние ростовых процессов на способность к закаливанию тканей озимых растений / И.И. Туманов и Т.И. Трунова // Физ. раст. – 1958. – Т.5, № 2. – С. 112–122.
44. Туманов И.И. Физиология закаливания и морозостойкости растений / И.И. Туманов. – М. : Наука, 1979. – 352 с.
45. Характер и последовательность изменений в фотосинтетическом аппарате растений озимой пшеницы в условиях холодного закаливания / А.Ф. Титов [и др.] // Труды Карельского научного центра РАН. – 2009. – № 3. – С. 93–97.
46. Хелдт Г.-В. Биохимия растений / Г.-В. Хелдт. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 471 с.

47. Хохлова Л.П. Сезонные изменения митохондрий у закаленных и незакаленных к холоду растений озимой пшеницы / Л.П. Хохлова, Н.Н. Кучеренкова, Й.Р. Абдрахимова // Физ. раст. – 1993. – Т. 40, № 4. – С. 607–612.
48. Хочачка П. Биохимическая адаптация / П. Хочачка и Дж. Сомеро. – М. : Мир, 1988. – 567 с.
49. Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений / Т.В. Чиркова. – СПб. : Изд-во Санкт-Петербургского ун-та, 2002. – 458 с.
50. Шугаев А.Г. Активность антиоксидантных ферментов в митохондриях растущих и покоящихся корнеплодов сахарной свеклы / А.Г. Шугаев, Д.А. Лаштабега, Н.А. Шугаева, Э.И. Выскребенцева // Физ. раст. – 2011. – Т. 58, № 3. – С. 323–329.
51. Шугаев А.Г. Методы выделения митохондрий растений и определение их интактности / Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии // А.Г. Шугаев, Д.А. Лаштабега, Н.С. Белозерова, И.П. Генерозова. Под ред. Вл.В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – С. 448–456.
52. Шугаев А.Г. Окисление малата митохондриями корнеплода сахарной свеклы, выделенными на различных этапах онтогенеза растений / А.Г. Шугаев и Э.И. Выскребенцева // Физ. раст. – 1984. – Т. 31, вып. 5. – С. 889–895.
53. Шугаев А.Г. Сезонные изменения активности митохондриальных оксидаз в высечках из взрослых листьев сахарной свеклы, определяемые с помощью традиционных методов ингибиторного анализа / А.Г. Шугаев, Э.И. Выскребенцева, Н.А. Шугаева // Физ. раст. – 1998. – Т. 45, № 5. – С. 670–678.
54. Шугаев А.Г. Цианид- и ротенон-резистентное дыхание митохондрий корнеплода сахарной свеклы в ходе онтогенеза / А.Г. Шугаев, Н.А. Шугаева, Э.И. Выскребенцева // Физ. раст. – 2006. – Т. 53, № 4. – С. 503–510.

55. Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment / G.B. Borovskii [et al.] // *BMC Plant Biol.* – 2002. – V. 2. – P. 5.
56. Alterations in the mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenase NDB4 lead to changes in mitochondrial electron transport chain composition, plant growth and response to oxidative stress / C. Smith [et al.] // *Plant Cell Physiol.* – 2011. – V. – 52, N 7. – P. 1222–1237.
57. Alternative oxidase involvement in cold stress response of *Arabidopsis thaliana fad2* and *FAD3+* cell suspensions altered in membrane lipid composition / A.R. Matos [et al.] // *Plant Cell Physiol.* – 2007. – V. 48. – P. 856–865.
58. Antioxidative enzymes from chloroplasts, mitochondria, and peroxisomes during leaf senescence of nodulated pea plants / J.M. Palma [et al.] // *J. Exp. Bot.* – 2006. – V. 57. – P. 1747–1758.
59. *Arabidopsis* genes encoding mitochondrial type II NAD(P)H dehydrogenases have different evolutionary origin and show distinct responses to light / A.M. Michalecka [et al.] // *Plant Physiol.* – 2003. – V. 133. – P. 642–652.
60. *Arabidopsis* kinesin KP1 specifically interacts with VDAC3, a mitochondrial protein, and regulates respiration during seed germination at low temperature / X.-Y. Yang [et al.] // *Plant Cell.* – 2011. – V. 23. – P. 1093–1106.
61. Araújo W.L. On the role of plant mitochondrial metabolism and its impact on photosynthesis in both optimal and sub-optimal growth conditions / W.L. Araújo, A. Nunes-Nesi, A.R. Fernie // *Photosynth Res.* – 2014. – V. 119. – P. 141–156.
62. A redox-mediated modulation of stem bolting in transgenic *Nicotiana sylvestris* differentially expressing the external mitochondrial NADPH dehydrogenase / Y.-J. Liu [et al.] // *Plant Physiol.* – 2009. – V. 150. – P. 1248–1259.

63. Arnon D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris* / D.I. Arnon // Plant Physiol. – 1949. – V. 24. – P. 1–15.
64. A specific form of thioredoxin *h* occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase / E. Gelhaye [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – V. 101. – P. 14545–14550.
65. 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. – P. 212–222.
66. Atkin O.K. Response of plant respiration to changes in temperature: mechanisms and consequences of variations in Q_{10} values and acclimation / O.K. Atkin, D. Bruhn, M.G. Tjoelker // Plant Respiration: From Cell to Ecosystem. – Hamburg : Springer, 2005. – P. 95–135.
67. 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. – P. 141–154.
68. Azcón-Bieto J. Effect of photosynthesis and carbohydrate status on respiratory rates and the involvement of the alternative pathway in leaf respiration / J. Azcón-Bieto, H. Lambers, D.A. Day // Plant Physiol. – 1983. – V. 72. – P. 598–603.
69. Bahr J.T. Cyanide-insensitive respiration. I. The steady states of skunk cabbage spadix and bean hypocotyl mitochondria / J.T. Bahr and W.D.Jr. Bonner // J. Biol. Chem. – 1973. – V. 248. – P. 3441–3445.
70. Bahr J.T. Cyanide-insensitive respiration. II. Control of the alternative pathway / J.T. Bahr and W.D.Jr. Bonner // J. Biol. Chem. – 1973. – V. 248. – P. 3446–3450.
71. Blokhina O. Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems / O. Blokhina and K.V. Fagerstedt // Physiol. Plant. – 2010. – V. 138. – P. 447–462.

72. Brunton C.J. Pathways for the oxidation of malate and reduced pyridine nucleotide by wheat mitochondria / C.J. Brunton and J.M. Palmer // Eur. J. Biochem. – 1973. – V. 39. – P. 283–291.

73. Busi M.V. Mitochondrial dysfunction affects chloroplast functions / M.V. Busi, M.E. Gomez-Lobato, A. Araya, D.F. Gomez-Casati // Plant Signal. Behav. – 2011. – V. 6, N 12. – P. 1904–1907.

74. Bykova N.V. Contribution of respiratory NAD(P)H dehydrogenases to glycine and glycine plus malate oxidation by pea leaf mitochondria // N.V. Bykova, A.U. Igamberdiev and I.M. Møller // In I.M. Møller, P. Garderström, K. Glimelius and E. Glaser, ed. Plant mitochondria: from genome to function. Leiden : Backhuys Publisher. – 1998. – P. 347–351.

75. Bykova N.V. Involvement of matrix NADP turnover in the oxidation of NAD⁺-linked substrates by pea leaf mitochondria / N.V. Bykova and I.M. Møller // Physiol. Plant. – 2001. – Vol. 111. – P. 448–456.

76. Chance B.W. The respiration chain and oxidative phosphorylation / B.W. Chance and V.R. Williams // Adv. Enzymol. – 1956. – V. 17. – P. 65–152.

77. Characterization of mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenases in Arabidopsis: interorganelle location and expression / D. Elhafez [et al.] // Plant Cell Physiol. – 2006. – V. 47. – P. 43–54.

78. Characterization of the plant uncoupling protein, *SrUCPA*, expressed in spadix mitochondria of the thermogenic skunk cabbage / Y. Ito-Inaba [et al.] // J. Exp. Bot. – 2008. – V. 59, N 4. – P. 995–1005.

79. Characterization of two non-homoeologous nuclear genes encoding mitochondrial alternative oxidase in common wheat / S. Takumi [et al.] // Gen. Genet. Syst. – 2002. – V. 77. – P. 81–88.

80. Chinnusamy V. Gene regulation during cold acclimation in plants / V. Chinnusamy, J. Zhu, J.-K. Zhu // Physiol. Plant. – 2006. – V. 126. – P. 52–61.

81. Chinnusamy V. Gene regulation during cold stress acclimation in plants / V. Chinnusamy, J. Zhu and R. Sunkar // Methods Mol. Biol. – 2010. – V. 639. – P. 39–55.

82. Clifton R. Alternative oxidases in *Arabidopsis*: a comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses / R. Clifton, A.H. Millar, J. Whelan // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – V. 1757. – P. 730–741.
83. Close T.J. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins / T.J. Close // *Physiol. Plant.* – 1996. – V. 97. – P. 795–803.
84. Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice / S. Yan [et al.] // *Mol. Cell Proteom.* – 2006. – P. 484–496.
85. Compelling EPR evidence that the alternative oxidase is a diiron carboxylate protein / A.L. Moore [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – V. 1777. – P. 327–330.
86. Complex I dysfunction redirects cellular and mitochondrial metabolism in *Arabidopsis* / M. Garmier [et al.] // *Plant Physiol.* – 2008. – V. 148. – P. 1324–1341.
87. Complex phytohormone responses during the cold acclimation of two wheat cultivars differing in cold tolerance, winter Samanta and spring Sandra / K. Kosová [et al.] // *Plant Physiol.* – 2012. – V. 169. – P. 567–576.
88. Cvetkovska M. Alternative oxidase impacts the plant response to biotic stress by influencing the mitochondrial generation of reactive oxygen species / M. Cvetkovska and G.C. Vanlerberghe // *Plant Cell Environ.* – 2013. – V. 36. – P. 721–732.
89. Davy de Virville J. Isolation and properties of mitochondria from *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures / J. Davy de Virville, I. Aron, M.F. Alin, F. Moreau // *Plant Physiol. Biochem.* – 1994. – V. 32. – P. 159–166.
90. Day D.A. Regulation of alternative oxidase activity by pyruvate in soybean mitochondria / D.A. Day, A.H. Millar, J.T. Wiskich, J. Whelan // *Plant Physiol.* – 1994. – V. 106. – P. 1421–1427.
91. Defining the mitochondrial stress response in *Arabidopsis thaliana* / O. Van Aken [et al.] // *Mol. Plant.* – 2009. – V. 2. – P. 1310–1324.

92. Detection of sugar accumulation and expression levels of correlative key enzymes in winter wheat (*Triticum aestivum*) at low temperatures / Y. Zeng [et al.] // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2011. – V. 75, N 4. – P. 681–687.
93. Dissecting the integrative antioxidant and redox systems in plant mitochondria. Effect of stress and S-nitrosylation / J.J. Lázaro [et al.] // *Plant Physiol.* – 2013. – V. 4, N 460. – P. 1–20.
94. Dynamic changes in the mitochondrial electron transport chain underpinning cold acclimation of leaf respiration / A.F. Armstrong [et al.] // *Plant Cell Environ.* – 2008. – V. 31. – P. 1156–1169.
95. Effects of light on cyanide-resistant respiration and alternative oxidase function in *Arabidopsis* seedling / D. Zhang [et al.] // *Plant Cell Environ.* – 2010. – V. 33. – P. 2121–2131.
96. Effect of light on the gene expression and hormonal status of winter and spring wheat plants during cold hardening / I. Majláth [et al.] // *Physiol. Plant.* – 2012. – V. 145. – P. 296–314.
97. Escobar M.A. Reorganization of the alternative pathways of the *Arabidopsis* respiratory chain by nitrogen supply: opposing effects of ammonium and nitrate / M.A. Escobar, D.A. Geisler, A.G. Rasmusson // *Plant J.* – 2006. – V. 45. – P. 775–788.
98. Estabrook R.W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratio / R.W. Estabrook // *Methods Enzimol.* – 1967. – V. 10. – P. 41–47.
99. Figueira T.R.S. Differential expression of uncoupling mitochondrial protein and alternative oxidase in the plant response to stress / T.R.S. Figueira and P. Arruda // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2011. – V. 43. – P. 67–70.
100. Finnegan P.M. Alternative mitochondrial electron transport proteins in the higher plants / P.M. Finnegan, K.L. Soole, A. Umbach // In D.A. Day, A.H. Millar and J. Whelan, ed. *Plant mitochondria: from genome to function*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. – P. 163–230.

101. 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. – P. 1795–1805.

102. Flexible change and cooperation between mitochondrial electron transport and cytosolic glycolysis as the basis for chilling tolerance in tomato plants / K. Shi [et al.] // *Planta.* – 2013. – V. 237. – P. 589–601.

103. Fredlund K.M. Oxidation of external NAD(P)H by purified mitochondria from fresh and aged red beetroot (*Beta vulgaris* L.) / K.M. Fredlund, A.G. Rasmusson, I.M. Møller // *Plant Physiol.* – 1991. – V. 97. – P. 99–103.

104. Gandin A. Disruption of the mitochondrial alternative oxidase (AOX) and uncoupling protein (UCP) alters rates of foliar nitrate and carbon assimilation in *Arabidopsis thaliana* / A. Gandin, M. Denysyuk and A.B. Cousins // *J. Exp. Bot.* – 2014. – V. 65, N. 12. – P. 3133–3142.

105. Gandin A. The absence of alternative oxidase *AOX1a* results in altered response of photosynthetic carbon assimilation to increasing CO₂ in *Arabidopsis thaliana* / A. Gandin, C. Duffes, D.A. Day, A.B. Cousins // *Plant Cell Physiol.* – 2012. – V. 53, N 9. – P. 1627–1637.

106. Geisler D.A. Ca²⁺-binding and Ca²⁺-independent respiratory NADH and NADPH dehydrogenases of *Arabidopsis thaliana* / D.A. Geisler, C. Broselid, L. Hederstedt, A.G. Rasmusson // *J. Biol. Chem.* – 2007. – V. 282, N 39. – P. 28455–28464.

107. Giraud E. The transcription factor ABI4 is a regulator of mitochondrial retrograde expression of ALTERNATIVE OXIDASE1a / E. Giraud, O. Van Aken, L.H.M. Ho and J. Whelan // *Plant Physiol.* – 2009. – V. 150. – P. 1286–1296.

108. Hammes E. Light-induced decrease in DCF fluorescence of wheat leaves in the presence of salicyl hydroxamate / E. Hammes, A. Hoffmann, C. Plieth and U.-P. Hansen // *Protoplasma.* – 2005. – V. 227. – P. 11–15.

109. Hanning I. On the function of mitochondrial metabolism during photosynthesis in spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves / I. Hanning and H.W. Heldt // *Plant Physiol.* – 1993. – V. 103. – P. 1147–1154.
110. Heidarvand L. What happens in plant molecular responses to cold stress? / L. Heidarvand and R.M. Amiri // *Acta Physiol. Plant.* – 2010. – V. 32. – P. 419–431.
111. Heterogeneity of plant mitochondrial responses underpinning respiratory acclimation to the cold in *Arabidopsis thaliana* leaves / A.F. Armstrong [et al.] // *Plant Cell Environ.* – 2006. – V. 29. – P. 940–949.
112. Hsiao K.-C. Salicylhydroxamic acid mimics esterase-like action / K.-C. Hsiao and C.H. Bornman // *J. Exp. Bot.* – 1993. – V. 44, N. 269. – P. 1847–1849.
113. Igamberdiev A.U. Membrane potential, adenylate levels and Mg^{2+} are interconnected via adenylate kinase equilibrium in plant cells / A.U. Igamberdiev and L.A. Kleczkowski // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2003. – V. 1607. – P. 111–119.
114. Importance of ROS and antioxidant system during the beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation / C. Dinakar [et al.] // *Planta.* – 2010. – V. 231. – P. 461–474.
115. Induction of the AOX1D isoform of alternative oxidase in *A. thaliana* T-DNA insertion lines lacking isoform AOX1A is insufficient to optimize photosynthesis when treated with antimycin A / I. Strodtkötter [et al.] // *Mol. Plant.* – 2009. – V. 2, N. 2. – P. 284–297.
116. Influence of chloroplastic photo-oxidative stress on mitochondrial alternative oxidase capacity and respiratory properties: a case study with *Arabidopsis yellow variegated 2* / K. Yoshida [et al.] // *Plant Cell Physiol.* – 2008. – V. 49. – P. 592–603.
117. *In vivo* cytochrome and alternative pathway respiration in leaves of *Arabidopsis thaliana* plants with altered alternative oxidase under different light

conditions / I. Florez-Sarasa [et al.] // *Plant Cell Environ.* – 2011. – V. 34. – P. 1373–1383.

118. Ito K. Expression of uncoupling protein and alternative oxidase depends on lipid or carbohydrate substrates in thermogenic plants / K. Ito and R.S. Seymour // *Biol. Lett.* – 2005. – V. 1. – P. 427–430.

119. Jarmuszkiewicz W. Uncoupling proteins in mitochondria of plants and some microorganisms / W. Jarmuszkiewicz // *Acta Biochimica Polonica.* – 2001. – V. 48, N 1. – P. 145–155.

120. Kaniuga Z. Chilling response of plants: importance of galactolipase, free fatty acids and free radicals / Z. Kaniuga // *Plant Biol.* – 2008. – V. 10. – P. 171–184.

121. Kaplan F. β -amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock / F. Kaplan and C.L. Guy // *Plant Physiol.* – 2004. – V. 135. – P. 1674–1684.

122. Keech O. Preparation of leaf mitochondria from *Arabidopsis thaliana* / O. Keech, P. Dizengremel, P. Gardestrom // *Physiol. Plant.* – 2005. – V. 124. – P. 403–409.

123. Kerscher S.J. Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases / S.J. Kerscher // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – V. 1459. – P. 274–283.

124. Kosová K. Role of dehydrines in plant stress response / K. Kosová, I.T. Prášil, P. Vítámvás // *Handbook of plant and crop stress.* In M. Pessarakli, ed. – CRC Press, 2010. – P. 239–285.

125. Krömer S. Respiration of pea leaf mitochondria and redox transfer between the mitochondrial and extramitochondrial compartment / S. Krömer and H.W. Heldt // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1991. – V. 1057. – P. 42–50.

126. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assemble of the head bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – V. 227. – P. 680–685.

127. Lambers H. Regulation of respiration *in vivo* / H. Lambers, S.A. Robinson and M. Ribas-Carbo // Plant Respiration: From Cell to Ecosystem. – Hamburg : Springer, 2005. – P. 1–15.
128. Lance C. The cyanide-resistant pathway of plant mitochondria / C. Lance, M. Chaveau, P. Dizengremel // Higher plant cell respiration: Encyclopedia of Plant Physiology; eds. R. Douce, D.A. Day. Springer-Verlag, Berlin, 1985. – V. 18. – P. 202–247.
129. Leaf respiration of snow gum in the light and dark. Interactions between temperature and irradiance / O.K. Atkin [et al.] // Plant Physiol. – 2000. – V. 122. – P. 915–923.
130. Lee C.P. Heterogeneity of the mitochondrial proteome for photosynthetic and non-photosynthetic Arabidopsis metabolism / C.P. Lee, H. Eubel, N. O’Toole, A.H. Millar // Mol. Cell Proteom. – 2008. – V. 7. – P. 1297–1316.
131. Lee D.H. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays // D.H. Lee and C.B. Lee // Plant Science. – 2000. – V. 159. – P. 75–85.
132. Light has a specific role in modulating Arabidopsis gene expression at low temperature / A.J. Soitamo [et al.] // BMC Plant Biol. – 2008. – V. 8, N 13. – P. 1–20.
133. Light regulation of mitochondrial alternative oxidase pathway during greening of etiolated wheat seedlings / E.V. Garmash [et al.] // J. Plant Physiol. – 2015. – V. 174. – P. 75–84.
134. Light regulation of the Arabidopsis respiratory chain. Multiple discrete photoreceptor responses contribute to induction of type II NAD(P)H dehydrogenase genes / M.A. Escobar [et al.] // Plant Physiol. – 2004. – V. 136. – P. 2710–2721.
135. Lissarre M. Cold-responsive gene regulation during cold acclimation in plants / M. Lissarre, M. Ohta, A. Sato and K. Miura // Plant Signal. Behav. – 2010. – V. 5, N 8. – P. 948–952.

136. Logan D.C. Mitochondrial and cytosolic calcium dynamics are differentially regulated in plants / D.C. Logan and M.R. Knight // *Plant Physiol.* – 2003. – V. 133. – P. 21–24.
137. Lowry O.H. Protein measurement with the folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // *J. Biol. Chem.* – 1951. – V. 193. – P. 265–275.
138. Lundmark M. Low temperature acclimation in plants alterations in photosynthetic carbon metabolism: doctoral dissertation Umeå Plant Science Centre Dept. of Plant Physiology Umeå University SE-901 87 Sweden / M. Lundmark. – Umeå, Sweden : Solfjädern Offset AB, 2007. – 69 p.
139. Lyons J.M. Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury / J.M. Lyons and J.K. Raison // *Plant Physiol.* – 1970. – V. 45. – P. 386–268.
140. Lyons J.M. Relationship between the physical nature of mitochondrial membranes and chilling sensitivity of plants / J.M. Lyons, T.A. Wheaton, H.K. Pratt // *Plant Physiol.* – 1964. – V. 39. – P. 262–268.
141. Maintenance of growth rate at low temperature in rice and wheat cultivars with a high degree of respiratory homeostasis is associated with a high efficiency of respiratory ATP production / K. Kurimoto [et al.] // *Plant Cell Physiol.* – 2004. – V. 45. – P. 1015–1022.
142. Maxwell D.P. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells / D.P. Maxwell, Y. Wang, L. McIntosh // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – V. 96. – P. 8271–8276.
143. McDonald A.E. Methods and approaches to study plant mitochondrial alternative oxidase / A.E. McDonald, S.M. Sieger and G.C. Vanlerberghe // *Physiol. Plant.* – 2002. – V. 116. – P. 135–143.
144. Metabolic control and regulation of the tricarboxylic acid cycle in photosynthetic and heterotrophic plant tissues / W.L. Araújo [et al.] // *Plant Cell Environ.* – 2012. – V. 35. – P. 1–21.

145. Metabolism and growth in *Arabidopsis* depend on the daytime temperature but are temperature-compensated against cool nights / E.-T. Pyl [et al.] // *Plant Cell*. – 2012. – V. 24. – P. 2443–2469.
146. Millar A.H. Specificity of the organic acid activation of alternative oxidase in plant mitochondria / A.H. Millar, M.H.N. Hoefnagel, D.A. Day, J.T. Wiskich // *Plant Physiol*. – 1996. – V. 111. – P. 613–618.
147. Miller R.W. Structural and functional responses of wheat mitochondrial membranes to growth at low temperatures / R.W. Miller, I.D.L. Roche, M.K. Pomeroy // *Plant Physiol*. – 1974. – V. 53. – P. 426–433.
148. 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.
149. Mitochondrial complex II has a key role in mitochondrial-derived reactive oxygen species influence on plant stress gene regulation and defense // C. Gleason [et al.] // *PNAS*. – 2011. – V. 108. – P. 10768–10773.
150. Mitochondrial composition, function and stress response in plants // R.P. Jacoby [et al.] // *J. Int. Plant Biol.* – 2012. – V. 54, N 11. – P. 887–906.
151. Mitochondrial uncoupling protein is required for efficient photosynthesis / L.J. Sweetlove [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2006. – V. 103. – P. 19587–19592.
152. Mizuno N. Mitochondrial alternative pathway is associated with development of freezing tolerance in common wheat / N. Mizuno, A. Sugie, F. Kobayashi, S. Takumi // *Plant Physiol*. – 2008. – V. 165. – P. 462–467.
153. Molecular distinction between alternative oxidase from monocots and dicots / M.J. Considine [et al.] // *Plant Physiol*. – 2002. – V. 129. – P. 949–953.
154. Møller I.M. Mitochondrial electron transport and oxidative stress / I.M. Møller // *Plant Mitochondria. Annual Plant Reviews*. – 2007. – V. 31. – P. 185–211.

155. Møller I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species / I.M. Møller // *Plant Physiol.* – 2001. – V. 52. – P. 561–591.
156. Monroy A.F. Low-temperature signal transduction: Induction of cold acclimation specific genes of alfalfa by calcium at 25 °C / A.F. Monroy and R.S. Dhindsa // *Plant Cell.* – 1995. – V. 7. – P. 321–331.
157. Navrot N. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria / N. Navrot, N. Rouhier, E. Gelhaye, J.-P. Jacquot // *Physiol. Plant.* – 2007. – V. 129. – P. 185–195.
158. Naydenov N.G. Profiling of mitochondrial transcriptome is germinating wheat embryos and seedlings subjected to cold, salinity and osmotic stresses / N.G. Naydenov, S. Khanam, M. Siniauskaya, C. Nakamura // *Genes Genet. Syst.* – 2010. – V. 85. – P. 31–42.
159. Nishimura M. Isolation and characterization of metabolically competent mitochondria from Spinach leaf protoplasts / M. Nishimura, R. Douce, T. Akazawa // *Plant Physiol.* – 1982. – V. 69. – P. 916–920.
160. Noctor G. Use of mitochondrial electron transport mutants to evaluate the effects of redox state on photosynthesis, stress tolerance and the integration of carbon/nitrogen metabolism / G. Noctor, C. Dutilleul, R.D. Paepe, C.H. Foyer // *J. Exp. Bot.* – 2004. – V. 55, N. 394. – P. 49–57.
161. Noguchi K. Effects of light intensity and carbohydrate status on leaf and root respiration / K. Noguchi // *Plant Respiration: From Cell to Ecosystem.* – Hamburg : Springer, 2005. – P. 63–83.
162. Oligosaccharin and ABA synergistically affect the acquisition of freezing tolerance in winter wheat / A.I. Zabotin [et al.] // *Plant Physiol. Biochem.* – 2009. – V. 47. – P. 854–858.
163. Oliveira de H.C. Nitric oxide degradation by potato tuber mitochondria: Evidence for the involvement of external NAD(P)H dehydrogenases / H.C. de Oliveira, A. Wulff, E.E. Saviani, I. Salgado // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – V. 1777. – P. 470–476.

164. Osmond C.B. What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants / C.B. Osmond // In N.R. Baker and J.R. Bowyer, ed. Photoinhibition of photosynthesis. Oxford: Bios Scientific Publishers limited. – 1994. – P. 1–24.

165. Ouellet M. Aromatic hydroxamic acids and hydrazides as inhibitors of the peroxidase activity of prostaglandin H₂ synthase-2 / M. Ouellet, S.M. Aitken, A.M. English, M.D. Percival // Arch. Biochem. Biophys. – 2004. – V. 1, N. 431. – P. 107–118.

166. Overexpression of an alternative oxidase gene, *OsAOX1a*, improves cold tolerance in *Oryza sativa* L. / C.R. Li [et al.] // Gen. Mol. Res. – 2013. – V. 12, N 4. – P. 5424–5432.

167. Overexpression of plant uncoupling mitochondrial protein in transgenic tobacco increases tolerance to oxidative stress / M. Brandalise [et al.] // J. Bioenerg. Biomembr. – 2003. – V. 35. – P. 203–209.

168. Overexpression of wheat alternative oxidase gene *Waox1a* alters respiration capacity and response to reactive oxygen species under low temperature in transgenic Arabidopsis / A. Sugie [et al.] // Gen. Genet. Syst. – 2006. – V. 81. – P. 349–354.

169. Pascal N. Comparison of the kinetic behavior toward pyridine nucleotides of NAD⁺-linked dehydrogenases from plant mitochondria / N. Pascal, R. Dumas and R. Douce // Plant Physiol. – 1990. – V. 94. – P. 189–193.

170. Pea seed mitochondria are endowed with a remarkable tolerance to extreme physiological temperatures / I. Stupnikova [et al.] // Plant Physiol. – 2006. – V. 140. – P. 326–335.

171. Plant dehydrins and stress tolerance. Versatile proteins for complex mechanisms / M. Hanin [et al.] // Plant Signal. Behav. – 2011. – V. 6. – P. 1503–1509.

172. Plant plasma membrane proteomics for improving cold tolerance / D. Takahashi [et al.] // Front. Plant Sci. – 2013. – V. 4, N 90. – P. 1–5.

173. Plant responses to cold: transcriptome analysis of wheat / M.O. Winfield [et al.] // *Plant Biotechnol. J.* – 2010. – V. 8, N 7. – P. 749–771.
174. Popov V.N. Inhibition of the alternative oxidase stimulates H₂O₂ production in plant mitochondria / V.N. Popov, R.A. Simonian, V.P. Skulachev, A.A. Starkov // *FEBS Lett.* – 1997. – V. 415. – P. 87–90.
175. Purvis A.C. Does the alternative pathway ameliorates chilling injury in sensitive plant tissue? / A.C. Purvis, R.L. Shewfelt // *Physiol. Plant.* – 1993. – V. 88. – P. 712–718.
176. Purvis A.C. Superoxide production by mitochondria isolated from green bell pepper fruit / A.C. Purvis, R.L. Shewfelt, J.W. Gegogaine // *Physiol. Plant.* – 1995. – V. 94. – P. 743–749.
177. Radkova M. Development- and cold-regulated accumulation of cold shock domain proteins in wheat / M. Radkova, P. Vítámvás, K. Sasaki, R. Imai // *Plant Physiol. Biochem.* – 2014. – V. 77. – P. 44–48.
178. Rasmusson A.G. Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria / A.G. Rasmusson, K.L. Soole, T.E. Elthon // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2004. – V. 55. – P. 23–39.
179. Rasmusson A.G. Involvement of mitochondria in the control of plant cell NAD(P)H reduction levels / A.G. Rasmusson and S.V. Wallström // *Biochem. Soc. Trans.* – 2010. – V. 38. – P. 661–666.
180. Rasmusson A.G. Rotenone-insensitive NAD(P)H dehydrogenases in plants: immunodetection and distribution of native proteins in mitochondria / A.G. Rasmusson and S.C. Agius // *Plant Physiol. Biochem.* – 2001. – V. 39. – P. 1057–1066.
181. 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. – P. 47–60.
182. Regulation of thermogenesis in plants: The interaction of alternative oxidase and plant uncoupling mitochondrial protein / Y. Zhu [et al.] // *J. Integr. Plant Biol.* – 2011. – V. 53. – P. 7–13.

183. Respiration in photosynthetic cells: gas exchange components, interaction with photorespiration and the operation of mitochondria in the light / V. Hurry [et al.] // *Plant Respiration: From Cell to Ecosystem*. – Hamburg : Springer, 2005. – P. 43–61.
184. Ribas-Carbo M. The application of the oxygen-isotope technique to assess respiratory pathway partitioning / M. Ribas-Carbo, S.A. Robinson, L. Giles // *Plant Respiration: From Cell to Ecosystem*. – Hamburg : Springer, 2005. – P. 31–42.
185. Rolland F. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms / F. Rolland, E. Baena-Gonzalez and J. Sheen // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2006. – V. 57. – P. 675–709.
186. Rook F. Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression / F. Rook, S.A. Hadingham, Y. LI and M.W. Bevan // *Plant, Cell and Envir.* – 2006. – V. – 29. – P. 426–434.
187. Rorat T. Plant dehydrins-tissue location, structure and function / T. Rorat // *Cell Mol. Biol. Lett.* – 2006. – V. 11. – P. 536–556.
188. Rustin P. Malate oxidation in plant mitochondria via malic enzyme and the cyanide-insensitive electron transport pathway / P. Rustin, F. Moreau, C. Lance // *Plant Physiol.* – 1980. – V. 66. – P. 457–462.
189. Sage R.F. The temperature response of C3 and C4 photosynthesis / R.F. Sage and D.S. Kubien // *Plant Cell Environ.* – 2007. – V. 30. – P. 1086–1106.
190. Sasaki K. Identification of a novel LEA protein involved in freezing tolerance in wheat / K. Sasaki, N.K. Christov, S. Tsuda, R. Imai // *Plant Cell Physiol.* – 2014. – V. 55, N 1. – P. 136–147.
191. Seppänen M.M. Characterization of freezing tolerance in *Solanum commersonii* (Dun.) with special reference to the relationship between freezing and oxidative stress: academic dissertation University of Helsinki Department of Plant Production / M.M. Seppänen. – Helsinki : Helsingin yliopiston verkkojulkaisu, 2000. – N. 56. – 53 p.

192. Sluse F.E. Activity and functional interaction of alternative oxidase and uncoupling protein in mitochondria from tomato fruit / F.E. Sluse and W. Jarmuszkiewicz // *Brazilian J. Medical Biol. Research.* – 2000. – V. 33. – P. 259–268.
193. Sonoike K. Photoinhibition of photosystem I: Its physiological significance in the chilling sensitivity of plants / K. Sonoike // *Plant Cell Physiol.* – 1996. – V. 37. – P. 239–247.
194. Stewart C.R. Seedling growth, mitochondrial characteristics, and alternative respiratory capacity of corn genotypes differing in cold tolerance / C.R. Stewart, B.A. Martin, L. Reding, S. Cerwick // *Plant Physiol.* – 1990. – V. 92. – P. 761–766.
195. Superoxide stimulates a proton leak in potato mitochondria that is related to the activity of uncoupling protein / M.J. Considine [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – P. 22298–22302.
196. Suppression of NDA-type alternative mitochondrial NAD(P)H dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana* modifies growth and metabolism, but not high light stimulation of mitochondrial electron transport / S.V. Wallström [et al.] // *Plant Cell Physiol.* – 2014. – V. 55, N. 5. – P. 881–896.
197. Suzuki N. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction / N. Suzuki and R. Mittler // *Physiol. Plant.* – 2006. – V. 126. – P. 45–51.
198. Svensson A.S. Cold stress decreases the capacity for respiratory NADH oxidation in potato leaves // A.S. Svensson, F.I. Johansson, I.M. Møller, A.G. Rasmusson. – *FEBS Lett.* – 2002. – V. 517. – P. 79–82.
199. Svensson A.S. Light-dependent gene expression for proteins in the respiratory chain of potato leaves / A.S. Svensson and A.G. Rasmusson // *Plant J.* – 2001. – V. 28. – P. 73–82.
200. Szal B. Chilling stress and mitochondrial genome rearrangement in the MSC16 cucumber mutant affect the alternative oxidase and antioxidant defense

system to a similar extent / B. Szal, K. Łukawska, I. Zdolinska, A.M. Rychter // *Physiol. Plant.* – 2009. – V. 137. – P. 435–445.

201. Tan Y.-F. Components of mitochondrial oxidative phosphorylation vary in abundance following exposure to cold and chemical stresses / Y.-F. Tan, A.H. Millar, N.L. Taylor // *J. Proteome Res.* – 2012. – V. 11. – P. 3860–3879.

202. Tarpey M.M. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: *in vitro* and *in vivo* considerations / M.M. Tarpey, D.A. Wink and M.B. Grisham // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2004. – V. 286 – P. 431–444.

203. Temperature acclimation of photosynthesis: mechanisms involved in the changes in temperature dependence of photosynthetic rate / K. Hikosaka [et al.] // *J. Exp. Bot.* – 2006. – V. 57, N 2. – P. 291–302.

204. The activity of plant inner membrane anion channel (PIMAC) can be performed by a chloride channel (CLC) protein in mitochondria from seedlings of maize populations divergently selected for cold tolerance / E. Tampieri [et al.] // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2011. – V. 43, N 6. – P. 611–21.

205. The activity of the plant mitochondrial inner membrane anion channel (PIMAC) of maize populations divergently selected for cold tolerance level is differentially dependent on the growth temperature of seedlings / A.D. Santis [et al.] // *Plant Cell Physiol.* – 2011. – V. 52, N 1. – P. 193–204.

206. The chloroplast lumen and stromal proteomes of *Arabidopsis thaliana* show differential sensitivity to short- and long-term exposure to low temperature / E. Goulas [et al.] // *Plant J.* – 2006. – V. 47. – P. 720–734.

207. The effects of phenotypic plasticity on photosynthetic performance in winter rye, winter wheat and *Brassica napus* / K. Dahal [et al.] // *Physiol. Plant.* – 2012. – V. 144. – P. 169–188.

208. The electron partitioning between the cytochrome and alternative respiratory pathways during chilling recovery in two cultivars of maize differing in chilling sensitivity / M. Ribas-Carbo [et al.] // *Plant Physiol.* – 2000. – V. 122. – P. 199–204.

209. The involvement of PUMP from mitochondria of *Araucaria angustifolia* embryogenic cells in response to cold stress / C. Valente [et al.] // *Plant Science*. – 2012. – V. 197. – P. 84–91.
210. Theocharis A. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures / A. Theocharis, C. Clément, E.A. Barka // *Planta*. – 2012. – V. 235. – P. 1091–1105.
211. The plant energy-dissipating mitochondrial systems: depicting the genomic structure and the expression profiles of the gene families of uncoupling protein and alternative oxidase in monocots and dicots / J. Borecký [et al.] // *J. Exp. Bot.* – 2006. – V. 57. – P. 849–864.
212. The role of different plant seedling shoots mitochondrial uncoupling systems in thermogenesis during low-temperature stress / O.I. Grabelnych [et al.] // *J. Therm. Biol.* – 2003. – V. 28. – P. 571–580.
213. Transcriptome comparison of winter and spring wheat responding to low temperature / P.J. Gulick [et al.] // *Genome*. – 2005. – V. 48. – P. 913–923.
214. Tremblay K. Molecular characterization and origin of novel bipartite cold-regulated ice recrystallization inhibition proteins from cereals / K. Tremblay // *Plant Cell Physiol.* – 2005. – V. 46, N 6. – P. 884–891.
215. Type II NAD(P)H dehydrogenases are targeted to mitochondria and chloroplasts or peroxisomes in *Arabidopsis thaliana* / C. Carrie [et al.] // *FEBS Letters*. – 2008. – V. 582. – P. 3073–3079.
216. Umbach A.L. Covalent and noncovalent dimers of the cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondria and their relationship to enzyme activity / A.L. Umbach and J.N. Siedow // *Plant Physiol.* – 1993. – V. 103. – P. 845–854.
217. Unraveling the heater: New insights into the structure of the alternative oxidase / A.L. Moore [et al.] // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2013. – V. 64. – P. 637–663.

218. Up-regulation of the mitochondrial alternative oxidase pathway enhances photosynthetic electron transport under drought conditions / C.G. Bartoli [et al.] // *J. Exp. Bot.* – 2005. – V. 56, N. 415. – P. 1269–1276.
219. Vanlerberghe G.C. Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants / G.C. Vanlerberghe // *Int. Mol. Sci.* – 2013. – V. 14. – P. 6805–6847.
220. 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 // *Plant Physiol. Biochem.* – 1990. – V. 25, N 5. – P. 623–630.
221. Wagner A.M. Stimulation of the alternative pathway by succinate and malate / A.M. Wagner, C.W.M. van den Bergen, H. Wincencjusz // *Plant Physiol.* – 1995. – V. 108. – P. 1035–1042.
222. Wang H. Involvement of hydrogen peroxide, calcium, and ethylene in the induction of the alternative pathway in chilling-stressed *Arabidopsis* callus / H. Wang, J. Huang, X. Liang, Y. Bi // *Planta.* – 2012. – V. 235. – P. 53–67.
223. Wang J. Impact of mitochondrial alternative oxidase expression on the response of *Nicotiana tabacum* to cold temperature / J. Wang, N. Rajakulendran, S. Amirsadeghi, C. Vanlerberghe // *Physiol. Plant.* – 2011. – V. 142. – P. 339–351.
224. Wang X. Profiling lipid changes in plant response to low temperatures / X. Wang, W. Li, M. Li, R. Welti // *Physiol. Plant.* – 2006. – V. 126. – P. 90–96.
225. Watanabe C.K. The lack of alternative oxidase at low temperature leads to a disruption of the balance in carbon and nitrogen metabolism, and to an up-regulation of antioxidant defence systems in *Arabidopsis thaliana* leaves / C.K. Watanabe, T. Hachiya, I. Terashima, K. Noguchi // *Plant Cell Environ.* – 2008. – V. 31. – P. 1190–1202.
226. Watling J.R. Mechanisms of thermoregulation in plants / J.R. Watling, N.M. Grant, R.E. Miller, S.A. Robinson // *Plant Signal. Behav.* – 2008. – V. 3. – P. 595–597.

227. Wu G. Isolation, chromosomal localization, and differential expression of mitochondrial manganese superoxide dismutase and chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase genes in wheat / G. Wu, R.W. Wilen, A.J. Robertson, L.V. Gusta // *Plant Physiol.* – 1999. – V. 120, N 2. – P. 513–520.

228. Xu F. Response of mitochondrial alternative oxidase (AOX) to light signals / F. Xu, S. Yuan and H.-H Lin // *Plant Signal. Behav.* – 2011. – V. 6, N 1. – P. 55–58.

229. Yoshida K. Distinct roles of the cytochrome pathway and alternative oxidase in leaf photosynthesis / K. Yoshida, I. Terashima, K. Noguchi // *Plant Cell Physiol.* – 2006. – V. 47, N 1. – P. 22–31.

230. Yoshida K. How and why does the mitochondrial respiratory chain respond to light / K. Yoshida, I. Terashima, K. Noguchi // *Plant Signal. Behav.* – 2011. – V. 6. – P. 864–866.

231. Yoshida K. Up-regulation of mitochondrial alternative oxidase concomitant with chloroplast over-reduction by excess light / K. Yoshida, I. Terashima, K. Noguchi // *Plant Cell Physiol.* – 2007. – V. 48, N. 4. – P. 606–614.

232. 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. – P. 579–585.