

На правах рукописи

Каф

КОРСУКОВА Анна Викторовна

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

03.01.05 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Иркутск – 2016

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

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент
Грабельных Ольга Ивановна

Официальные оппоненты:

Жигачева Ирина Валентиновна
доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН), ведущий научный сотрудник лаборатории физико-химических основ регуляции биологических систем

Разина Альфия Агламзановна
кандидат биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Иркутский научно-исследовательский институт сельского хозяйства» (Иркутский НИИСХ), старший научный сотрудник лаборатории агрохимии и защиты растений

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (ФГАОУ ВО КФУ)

Защита диссертации состоится «24» июня 2016 г. в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 003.047.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Сибирском институте физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук по адресу: 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317.

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

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

Автореферат разослан «___» _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
Д 003.047.01,
кандидат биологических наук



Г.П. Акимова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Формирование морозоустойчивости растений обусловлено различными изменениями клеточного метаболизма, в том числе увеличением содержания сахаров, усилением синтеза стрессовых белков, изменением свойств мембран, процессов дыхания, фотосинтеза и др. (Трунова, 2007; Szalai et al., 2009; Theocharis et al., 2012; Vítamvás et al., 2012). Успешное закаливание определяет выживаемость растений в поздний зимний и ранний весенний периоды (Пыйклик, 1963). Сохранение свойств морозоустойчивости имеет большое значение при выходе озимых из состояния вынужденного покоя и переходе к вегетации. Регуляторы роста повышают морозоустойчивость растений, удлиняя период покоя. Так, абсцизовая кислота (АБК) способствует накоплению сахаров (Kerepesi et al., 2004; Liu et al., 2013), стрессовых белков (Шакирова и др., 2009; Титов и Таланова, 2011; Theocharis et al., 2012), стабилизирует клеточные мембраны, повышая ненасыщенность жирных кислот (ЖК) (Bakht et al., 2006).

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

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

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

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

Положения, выносимые на защиту

1. Тебуконазол-содержащий протравитель семян, проявляющий ретардантный эффект на проростках злаков, способствует повышению ненасыщенности жирных кислот, синтезу дегидринов и накоплению водорастворимых углеводов – факторов, определяющих низкотемпературную адаптацию растений.

2. Фунгицид тебуконазол оказывает влияние на дыхательный метаболизм злаков, снижая скорость окисления субстратов дыхания митохондриями. Действие тебуконазола направлено на комплекс I дыхательной цепи митохондрий растений.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное изучение влияния тебуконазол-содержащего протравителя семян (содержание тебуконазола 60 г/л) на параметры морозоустойчивости злаков. Установлено, что обработка семян яровых и озимых злаков тебуконазол-содержащим протравителем семян вызывает ингибирование роста побегов и приводит к изменению углеводного, жирнокислотного и белкового метаболизма в проростках злаков. Впервые показано, что после обработки семян тебуконазол-содержащим препаратом в клетках злаков происходят метаболические изменения, характерные для низкотемпературной адаптации – увеличение содержания водорастворимых углеводов и ненасыщенных жирных кислот. Выявлено, что закалённые к холоду проростки яровой и озимой пшеницы из обработанных семян характеризуются повышенным содержанием водорастворимых углеводов, синтезом низкомолекулярных дегидринов и ростом холодо- и морозоустойчивости. Более высокое содержание сахаров, дегидринов и ненасыщенных жирных кислот у проростков из обработанных семян способствует сохранению морозоустойчивости озимой пшеницы в период раззакаливания и снижает гибель растений при последующем действии отрицательной температуры.

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

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные расширяют современные представления о механизмах холодо- и

морозоустойчивости растений и свидетельствуют о возможности формирования повышенной устойчивости озимых культур к перенесению неблагоприятных низких температур под действием обработки семян тебуконазол-содержащими препаратами. Созданы предпосылки использования фунгицидов триазольной природы для повышения устойчивости озимых злаков к отрицательным температурам в зимний и ранневесенний периоды.

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

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

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

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

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 научных работ, в том числе 3 статьи в журналах из Перечня ВАК РФ.

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

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Обзор литературы

В разделе рассматривается влияние низких температур на растения, приводятся основные физиолого-биохимические механизмы низкотемпературного закаливания растений, такие как торможение ростовых процессов, изменение липидного и жирнокислотного состава, синтез стрессовых белков, накопление сахаров, изменение дыхательного метаболизма. Отдельная глава посвящена физиолого-биохимическим процессам, протекающим в период раззакаливания растений, и температурной зависимости скорости протекания данного процесса. Также представлена характеристика ростиингибирующих соединений, которые могут выступать в качестве модуляторов холодо- и морозоустойчивости растений. Отражено применение ретардантов в сельском хозяйстве. Особое внимание уделяется фунгицидам триазольной природы как возможным регуляторам холодо- и морозоустойчивости злаков.

2. Материалы и методы

Объект исследования. В работе использовались этиолированные проростки мягкой яровой (сорт «Новосибирская 29»), озимой (сорт «Иркутская») пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и озимой ржи (*Secale cereale* L., сорт «Чулпан»). Проростки выращивали в течение 3-10-и суток в темноте при температуре 24 °С в кюветах на влажной фильтровальной бумаге (на воде) – контрольные растения (К).

Обработка семян препаратом «Бункер». В работе использовали тебуконазол-содержащий (содержание тебуконазола 60 г/л) препарат «Бункер» («Август», Россия) – системный фунгицид (водно-суспензионный концентрат) для протравливания семян профилактического и лечебного действия. Промытые и просушенные семена обрабатывались препаратом непосредственно перед их проращиванием. Использовали водный раствор препарата «Бункер» (0,5; 1; 1,5; 3; 4; 5 мкл/г семян).

Обработка этиолированных проростков злаков водными растворами тебуконазола. Выращенные на воде двухсуточные проростки обрабатывали 0,1 мМ и 1 мМ растворами тебуконазола (Tebuconazol PESTANAL, “Sigma-Aldrich”, Германия). Для приготовления растворов использовали водный раствор 0,1% DMSO. Воду из кювет заменяли растворами тебуконазола и выращивали проростки в течение суток (до трёхсуточного возраста) в темноте при 24 °С. Затем растворы сливали, проростки промывали водой и в дальнейшем выращивали на воде.

Методы. Холодовое закаливание трёхсуточных этиолированных проростков проводили в темноте при 2 °С в течение 7 суток.

Относительную морозоустойчивость проростков определяли по их отрастанию после ступенчатого промораживания (Самыгин, 1967). Промораживание закалённых проростков проводили при температурах –2, –4, –6, –8, –10 °С (по 24 часа). Раззакаливание закалённых проростков осуществляли при температурах –8 (12 часов), –6, –4, 0 (по 24 часа), 4 °С (12 часов). Снижение/повышение температуры происходило со скоростью 1 °С/ч один раз в сутки. Промораживание раззакалённых проростков проводили при температуре –6

°С (24 часа). После низкотемпературных обработок проростки выдерживали при 2 °С (24 часа), затем оставляли отрастать при 24 °С (7 суток) для определения выживаемости. Выживаемость холодозакалённых проростков определяли после низкотемпературных обработок при -6, -7, -8, -10 °С, а выживаемость разакалённых проростков – при температуре -6 °С.

Степень ингибирования ростовых процессов (по изменению длины колеоптилей пятисуточных проростков) определяли по методике (Иванов, 1974).

Для определения жизнеспособности клеток колеоптилей этиолированных проростков злаков использовали метод восстановления красителя 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида (ТТХ) (Еникеев и др., 1995).

Для определения количественного содержания водорастворимых углеводов в побегах этиолированных проростков злаков использовали антроновый реактив (0,2% антрон в концентрированной серной кислоте) (Дише, 1967).

Для изучения жирнокислотного состава этиолированных проростков злаков анализировали метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) (Грабельных и др., 2014a). Анализ МЭЖК проводили методом газожидкостной хроматографии на хромато-масс-спектрометре 5973N/6890N MSD/DS (“Agilent Technologies”, США). Для идентификации МЭЖК проводили расчёт эквивалентной длины алифатической цепи, использовали библиотеки масс-спектров NIST 05, Christie и сравнение времени удерживания со временем удерживания стандартных соединений. Относительное содержание ЖК определяли в весовых процентах (вес. %) от общего их содержания в образце. Для оценки степени ненасыщенности ЖК рассчитывали индекс двойной связи (ИДС) (Lyons et al., 1964). Рассчитывали сумму ненасыщенных ЖК ($\Sigma_{\text{ннжк}}$), сумму насыщенных ЖК ($\Sigma_{\text{нжк}}$) и отношение суммы ненасыщенных ЖК к сумме насыщенных ЖК ($\Sigma_{\text{ннжк}}/\Sigma_{\text{нжк}}$).

Выделение митохондрий из побегов этиолированных проростков проводили по методике (Побежимова и др., 2004).

Полярнографическим методом определяли окислительную и фосфорилирующую активность изолированных митохондрий, а также интенсивность дыхания побегов этиолированных проростков злаков. Для полярнографического анализа использовали платиновый электрод закрытого типа (электрод Кларка) и полярнограф Oxytherm system (“Hansatech Inst.”, Англия), используя объём ячейки 1,4 мл. В качестве субстратов окисления использовали 10 мМ малат в присутствии 10 мМ глутамата; 8 мМ сукцинат в присутствии 5 мМ глутамата и 3 мкМ ротенона; 1 мМ НАД·Н; 2 мМ аскорбат плюс 0,2 мМ тетраметил-п-фенилендиамин (ТМФД). Глутамат добавляли для устранения оксалоацетатного ингибирования. При окислении НАД·Н из состава среды инкубации исключали ЭДТА и для активации «внешней» ротенон-нечувствительной НАД·Н дегидрогеназы включали 0,06 мМ CaCl₂ (Møller et al., 1981). Для ингибирования цитохромного пути (ЦП) использовали 0,4 мМ (митохондрии) и 0,8 мМ (побеги) KCN, для ингибирования альтернативного пути (АП) – 1 мМ (митохондрии) и 2 мМ (побеги) бензгидроксамовую кислоту (БГК). Вклад ЦП рассчитывали, как дыхание, ингибируемое KCN, а вклад АП, связанного с функционированием

альтернативной оксидазы (АО), как дыхание, ингибируемое БГК в присутствии KCN (потенциальная активность АО).

Суммарный клеточный белок выделяли по методике (Побежимова и др., 2004), а цитоплазматический и митохондриальный белки – по методике (Корсукова и др., 2013a). Концентрацию белка определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1951).

Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) проводили в модифицированной системе Лэммли (Laemmli, 1970), используя прибор для электрофореза Mini-PROTEAN III Electrophoretic Cell (“Bio-Rad”, США). Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану Amersham Protran Premium 0,45 NC (“GE Healthcare Life Sciences”, Германия), используя Mini Trans-Blot (“Bio-Rad”, США). Обработку антителами проводили согласно рекомендациям фирмы-изготовителя. Использовали поликлональные антитела против дегидринов (антитела против синтетического пептида, содержащего последовательность KIKKELPG, являющуюся частью К-сегмента дегидринов) в разведении 1 : 1000 (ADI-PLA-100, “StressGen”, США).

Для проведения статистической обработки данных использовали программный пакет SigmaPlot 12.5. Эксперименты проводили не менее чем в трёх независимых повторностях (n). Полученные данные представляли в виде средней арифметической (M) или медианы (Me), а разброс значений – в виде стандартного отклонения ($\pm S.D.$) или интерквартильной широты [25%;75% процентиль]. С помощью критерия Шапиро-Уилка проверяли нормальность распределения (ГОСТ Р ИСО 5479-2002). При нормальном распределении для доказательства наличия значимых различий между средними применяли однофакторный дисперсионный анализ с последующим множественным сравнением средних по методу LSD (Least Significant Difference) Фишера – метод группирования выборок с наименьшей значимой разностью. Если распределение отличалось от нормального, для доказательства наличия значимых различий между медианами использовали H -критерий Краскела-Уоллиса (Трухачева, 2012). Различия между данными считали статистически значимыми при $P \leq 0,05$ (Гланц, 1999).

3. Результаты исследования и обсуждение

3.1. Тебуконазол-содержащий протравитель семян «Бункер» эффективно ингибирует ростовые процессы проростков злаков, но не оказывает фитотоксичного действия на клетки растений

На этиолированных проростках злаков, выращенных из семян, обработанных протравителем «Бункер» (0,5; 1; 1,5; 3; 4; 5 мкл/г семян) выявлено концентрационно-зависимое действие препарата на ингибирование роста coleoptилей (рис. 1a) и увеличение восстановительной активности клеток этих coleoptилей (рис. 1б). Наиболее эффективно препарат ингибировал рост coleoptилей яровой и озимой пшеницы (рис. 1a). Наблюдаемое ингибирование ростовых процессов подтверждает данные, имеющиеся в литературе, относительно наличия у тебуконазола ретардантных свойств (Прусакова и Чижова, 1998).

Увеличение восстановительной активности клеток (рис. 1б), вероятно, связано с тем, что тебуконазол-содержащий препарат снижает скорость потребления

НАД·Н клетками колеоптилей из-за угнетения дыхания, как будет показано далее (рис. 7). Повышенная восстановительная активность клеток свидетельствует и о более высокой их жизнеспособности. Можно предполагать, что тебуконазол-содержащий препарат, являясь ретардантом, тормозит старение проростков, поэтому пятисуточные проростки из обработанных препаратом семян по физиологическому возрасту не соответствовали пятисуточным контрольным проросткам. Ранее в наших исследованиях было показано, что на 5-6-е сутки роста этиолированных проростков озимой пшеницы уже наблюдается гибель клеток колеоптилей (Корсукова и др., 2013а). Полученные в настоящей работе результаты согласуются с данными, имеющимися в литературе, о сдвиге сроков старения у растений под действием ретардантов (Прусакова и Чижова, 1998; Павлова, 2003).

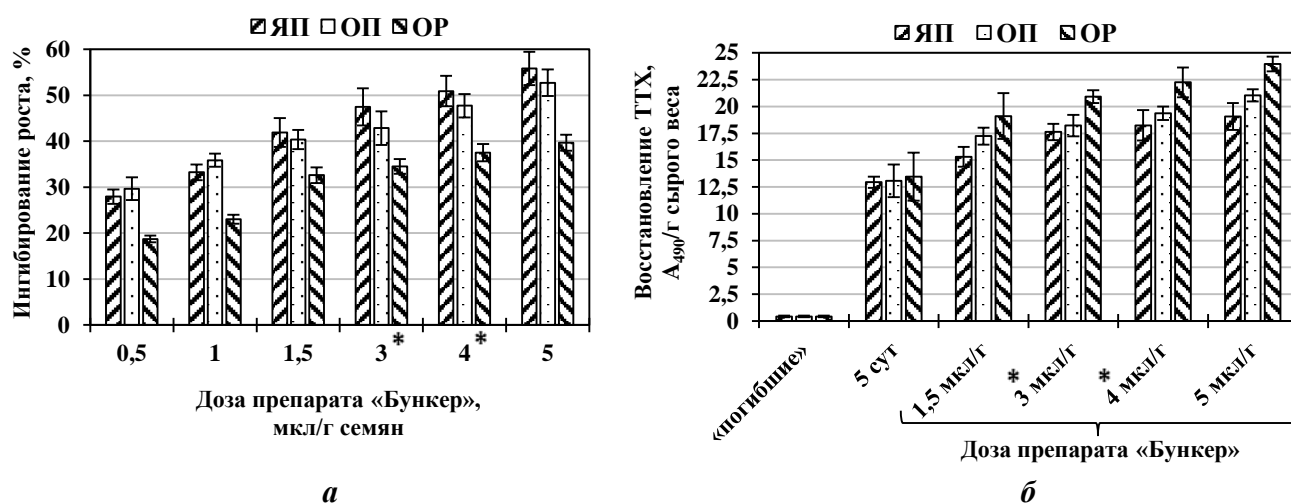


Рис. 1. Влияние препарата «Бункер» на рост колеоптилей (*а*) и на жизнеспособность клеток колеоптилей этиолированных проростков злаков (*б*)

Примечание: $n=4$ (*а*), $n=3$ (*б*). $M \pm S.D.$ * – между вариантами 3 и 4 (мкл/г семян) не обнаружено статистически значимых отличий для каждого злака, в остальных случаях отличия значимы.

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

Степень ингибирования длины колеоптилей проростков злаков препаратом «Бункер» 1,5 мкл/г семян статистически значимо отличалась от величины ингибирования при 0,5, 1 и 3 мкл/г семян, в то же время между вариантами 3 и 4 мкл/г семян статистически значимых отличий не было (рис. 1а). Поэтому для дальнейших исследований была выбрана доза протравителя «Бункер» 1,5 мкл/г семян.

3.2. Влияние тебуконазол-содержащего протравителя семян «Бункер» на физиолого-биохимические параметры низкотемпературного закаливания яровой пшеницы, озимой пшеницы и озимой ржи

Повышенное содержание криопротекторных соединений и ненасыщенных ЖК, синтез стрессовых белков в числе основных определяют развитие холодо- и морозоустойчивости растений (Трунова, 2007). Обработка семян исследуемых злаков препаратом «Бункер» оказывала влияние на такие физиолого-биохимические параметры низкотемпературного закаливания растений, как изменение жирнокислотного состава, содержания дегидринов и сахаров.

Обработка семян злаков тебуконазол-содержащим препаратом приводила к увеличению степени ненасыщенности ЖК побегов этиолированных проростков злаков, главным образом, за счёт снижения содержания пальмитиновой кислоты (C16:0) и повышения содержания α -линоленовой кислоты (C18:3(n-3)) (рис. 2).

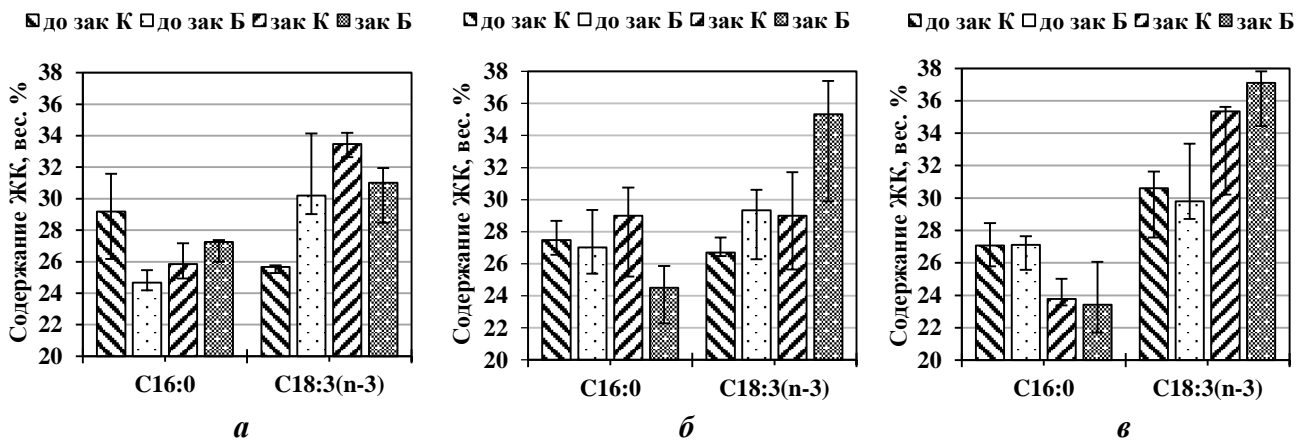


Рис. 2. Влияние препарата «Бункер» на жирнокислотный состав в тканях побегов этиолированных проростков яровой пшеницы (а), озимой пшеницы (б) и озимой ржи (в)

Примечание: $n=3-4$. Ме [25%;75%]. В тексте обсуждаются только статистически значимые отличия.

Обозначения: К – проростки, выращенные из необработанных семян; Б – проростки, выращенные из семян, обработанных препаратом «Бункер»; до зак – проростки «до закаливания» (24 °С, 3 суток); зак – закалённые проростки (2 °С, 7 суток).

Повышение степени ненасыщенности ЖК у незакалённых к холоду проростков из обработанных препаратом «Бункер» семян наблюдалось у всех исследуемых злаков. Такое изменение жирнокислотного состава было аналогично эффекту низкотемпературного закаливания (рис. 2). При этом закалённые к холоду проростки озимой пшеницы и ржи из обработанных семян характеризовались более высоким уровнем ненасыщенности ЖК по сравнению с закалёнными контрольными растениями (рис. 2б, в). Важно заметить, что по содержанию α -линоленовой кислоты – маркера криорезистентности растительных клеток (Верещагин, 2007) холодозакалённые проростки озимой пшеницы из обработанных семян приближались к уровню холодозакалённых проростков озимой ржи из необработанных семян (рис. 2б, в). Увеличение степени ненасыщенности ЖК в проростках из обработанных семян характеризовалось повышением показателя ИДС и отношения $\Sigma_{\text{ннжк}}/\Sigma_{\text{жк}}$, что было наиболее выражено у закалённых проростков озимых злаков, особенно у ржи (данные представлены в диссертации, гл. 3.2.1). В литературе имеются данные об АБК-индуцируемой десатурации НЖК мембранных липидов (Bakht et al., 2006). Принимая во внимание то, что производные триазола приводят к увеличению содержания эндогенной АБК (Павлова и др., 1995; Прусакова и Чинова, 1998; Павлова, 2003; Чинова и др., 2005), можно предположить, что увеличение степени ненасыщенности ЖК в побегах проростков злаков, выращенных из семян, обработанных тебуконазол-содержащим препаратом «Бункер» (как до, так и после закаливания), является АБК-зависимым.

Учитывая важную роль дегидринов при низкотемпературной адаптации (Close, 1997; Goyal et al., 2005; Rorat, 2006; Hara, 2010; Hanin et al., 2011) и при

раззакаливания (Kalberer et al., 2006) было изучено влияние обработки семян препаратом «Бункер» на содержание дегидринов в тканях побегов проростков злаков до закаливания, в закалённом состоянии и после раззакаливания (рис. 3).

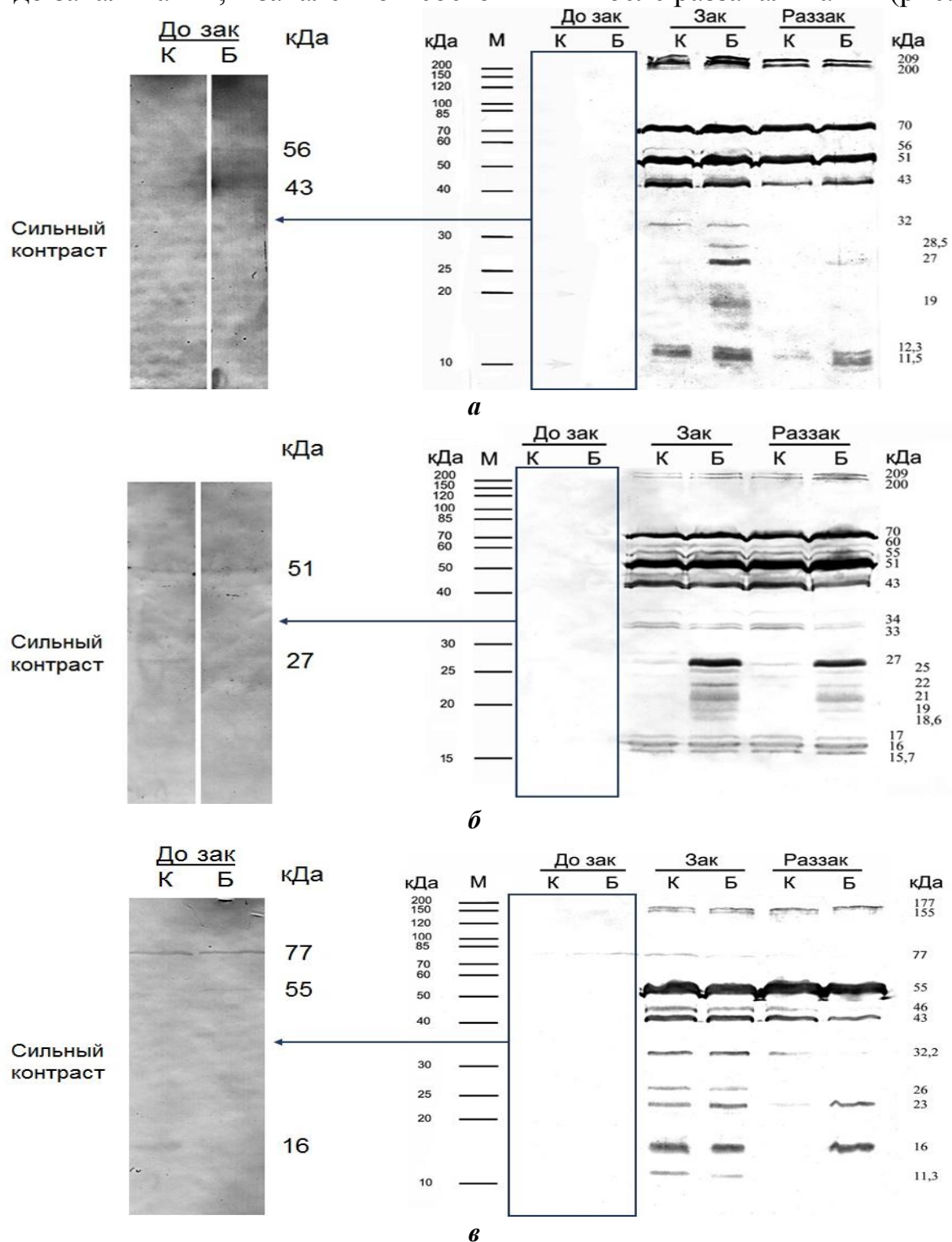


Рис. 3. Содержание дегидринов в тканях побегов этиолированных проростков яровой пшеницы (а), озимой пшеницы (б) и озимой ржи (в), выращенных из семян, необработанных и обработанных препаратом «Бункер»

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

Обозначения: М – белковые маркеры (“Thermo Scientific”, Литва); кДа – молекулярная масса маркеров (слева) и молекулярная масса дегидринов (справа); К и Б – как на рис. 2; До зак – проростки «до закаливания» (24 °С, 3 суток); Зак – закалённые проростки (2 °С, 7 суток); Раззак – проростки после раззакаливания (4 °С, 12 часов).

Обработка семян тебуконазол-содержащим протравителем индуцировала в побегах яровой и озимой пшеницы появление новых дегидринов с мол. массами 19, 27, 28,5 кДа и 18,6, 19, 21, 22, 25 кДа, соответственно (рис. 3а, б). При закаливании проростков яровой и озимой пшеницы из обработанных семян наблюдали значительное повышение содержания полипептида с мол. массой 27 кДа. Этот же полипептид детектировался и после раззакаливания данных злаков (рис. 3а, б). Следует отметить, что спектр дегидринов у морозоустойчивой озимой пшеницы (даже у растений из необработанных семян) был разнообразнее спектра дегидринов холодоустойчивой яровой пшеницы (как у контрольных растений, так и у растений, выращенных из обработанных семян) (рис. 3а, б). Обработка тебуконазол-содержащим препаратом семян озимой ржи не приводила к синтезу новых дегидринов после закаливания растений, однако у растений из обработанных семян после раззакаливания продолжали детектироваться полипептиды с мол. массами 16 и 23 кДа (рис. 3в). Известно, что синтез ряда дегидринов может индуцироваться АБК (Аллагулова и др., 2003; Thomashow, 1999; Rorat, 2006; Hanin et al., 2011). Вероятно, синтез дегидринов, индуцируемых обработкой тебуконазол-содержащим препаратом «Бункер», является АБК-зависимым, поскольку производные триазола повышают уровень АБК в клетках растений (Павлова и др., 1995; Прусакова и Чижова, 1998; Павлова, 2003; Чижова и др., 2005). Имеются данные о положительной связи между увеличением содержания сахаров и индукцией синтеза ряда низкомолекулярных дегидринов у озимой пшеницы (Боровик, 2015). Возможно, что тебуконазол-зависимая индукция синтеза дегидринов (рис. 3а, б) связана с изменением углеводного статуса в тканях злаков.

Обработка семян тебуконазол-содержащим протравителем «Бункер» сопровождалась увеличением содержания сахаров у всех исследуемых злаков как при нормальных температурных условиях, так и при холодном закаливании, и более экономным расходом сахаров в процессе роста (рис. 4).

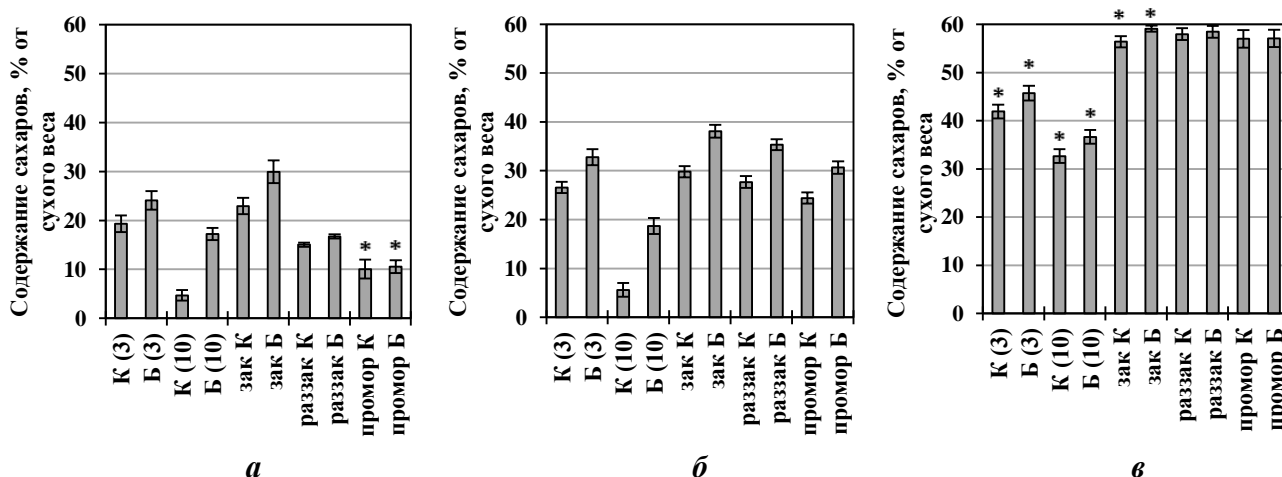


Рис. 4. Влияние препарата «Бункер» на изменение содержания сахаров в этилированных проростках яровой пшеницы (а), озимой пшеницы (б) и озимой ржи (в)

Примечание: $n=3$. $M \pm S.D.$ (а) * – между вариантами промор К и промор Б не обнаружено статистически значимых отличий. (в) * – различия между вариантами К (3), Б (3), К (10), Б (10), зак К и зак Б статистически значимы.

Обозначения: К и Б – как на рис. 2; (3) и (10) – возраст проростков в сутках (при 24 °С); зак и раззак – как на рис. 3; промор – раззакалённые проростки после промораживания (–6 °С, 24 часа).

Изменения в содержании сахаров наиболее явно были выражены в проростках озимой пшеницы. Так, обработка тебуконазол-содержащим препаратом семян озимой пшеницы не только увеличивала содержание водорастворимых углеводов, но и способствовала их поддержанию на повышенном уровне после закаливания, раззакаливания и промораживания раззакалённых растений (рис. 4б). В то же время у проростков яровой пшеницы из обработанных семян и контрольных растений не было обнаружено статистически значимых отличий в содержании сахаров после промораживания раззакалённых проростков (рис. 4а), а у проростков озимой ржи – после раззакаливания растений и последующего их промораживания (рис. 4в).

Можно предполагать, что различный уровень содержания сахаров у исследуемых злаков зависит от интенсивности их дыхания, поскольку водорастворимые углеводы являются основными субстратами дыхания (Головко, 1999; Трунова, 2007). Анализ интенсивности дыхания тканей изученных злаков показал, что у проростков озимой пшеницы и ржи из обработанных препаратом «Бункер» семян наблюдалась тенденция к увеличению интенсивности дыхания при закаливании, но не было статистически значимых отличий интенсивности дыхания после закаливания и раззакаливания (рис. 5б).

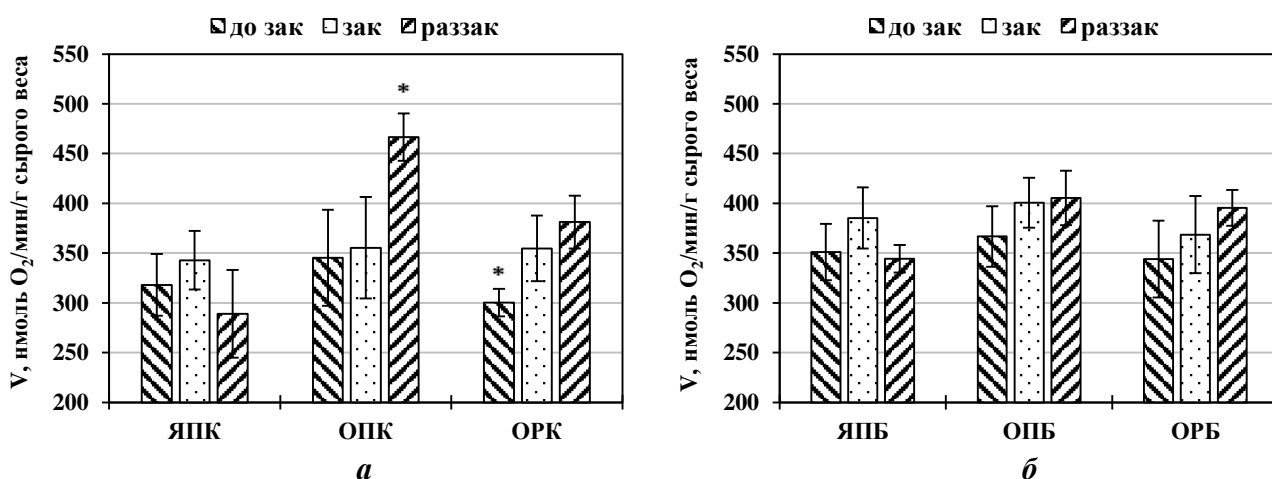


Рис. 5. Интенсивность дыхания тканей побегов этиолированных проростков изученных злаков, выращенных из семян, необработанных (а) и обработанных препаратом «Бункер» (б)

Примечание: $n=3$. $M \pm S.D.$ (а) для вариантов ОПК: * – между вариантами ОПК (до зак и зак) и вариантом ОПК (раззак) обнаружены статистически значимые отличия; для вариантов ОРК: * – между вариантом ОРК (до зак) и вариантами ОРК (зак и раззак) обнаружены статистически значимые отличия.

Обозначения: ЯП, ОП, ОР – как на рис. 1; К и Б – как на рис. 2; до зак, зак и раззак – как на рис. 3; V – общая скорость поглощения кислорода.

Интенсивность дыхания проростков озимой ржи из обработанных и необработанных семян статистически значимо не отличалась (рис. 5). Возможно, поддержание интенсивности дыхания тканей побегов раззакалённых проростков озимой ржи (контрольных растений и растений из обработанных семян) на уровне интенсивности дыхания закалённых проростков, способствовало более экономному расходованию сахаров и, следовательно, более длительному их поддержанию на высоком уровне (рис. 4в). Больше (по сравнению с контролем) содержание сахаров у раззакалённых проростков озимой пшеницы из обработанных семян (рис. 4б), как и у проростков озимой ржи, вероятно, было связано с поддержанием интенсивности их дыхания на уровне дыхания закалённых

растений (рис. 5б). Тогда как у проростков озимой пшеницы из необработанных семян при раззакаливании дыхание резко возрастало (рис. 5а), что могло приводить к истощению сахаров (рис. 4б). У проростков яровой пшеницы как у контрольных растений (рис. 5а), так и у проростков, выращенных из обработанных препаратом «Бункер» семян (рис. 5б), наблюдалась тенденция к увеличению интенсивности дыхания в закалённом состоянии, а после раззакаливания интенсивность дыхания снижалась до уровня дыхания незакалённых растений (рис. 5).

Таким образом, обработка семян злаков тебуконазол-содержащим препаратом «Бункер» вызывала повышение степени ненасыщенности ЖК, увеличение содержания сахаров и появление новых дегидринов при закаливании, сохраняющихся при раззакаливании. У озимой пшеницы, выращенной из обработанных семян, интенсивность дыхания в тканях побегов при раззакаливании поддерживалась на уровне дыхания закалённых растений.

3.3. Влияние тебуконазол-содержащего протравителя семян «Бункер» на холодо- и морозоустойчивость злаков при закаливании и после раззакаливания

Обработка семян тебуконазол-содержащим препаратом «Бункер», оказывающая влияние на вышеизложенные физиолого-биохимические параметры низкотемпературного закаливания (см. 3.2), приводила к повышению холодо- и морозоустойчивости яровой и озимой пшеницы при закаливании (рис. 6а) и после раззакаливания (рис. 6б). При этом выживаемость растений озимой ржи составляла 100% независимо от варианта опыта (данные представлены в диссертации, гл. 3.3).

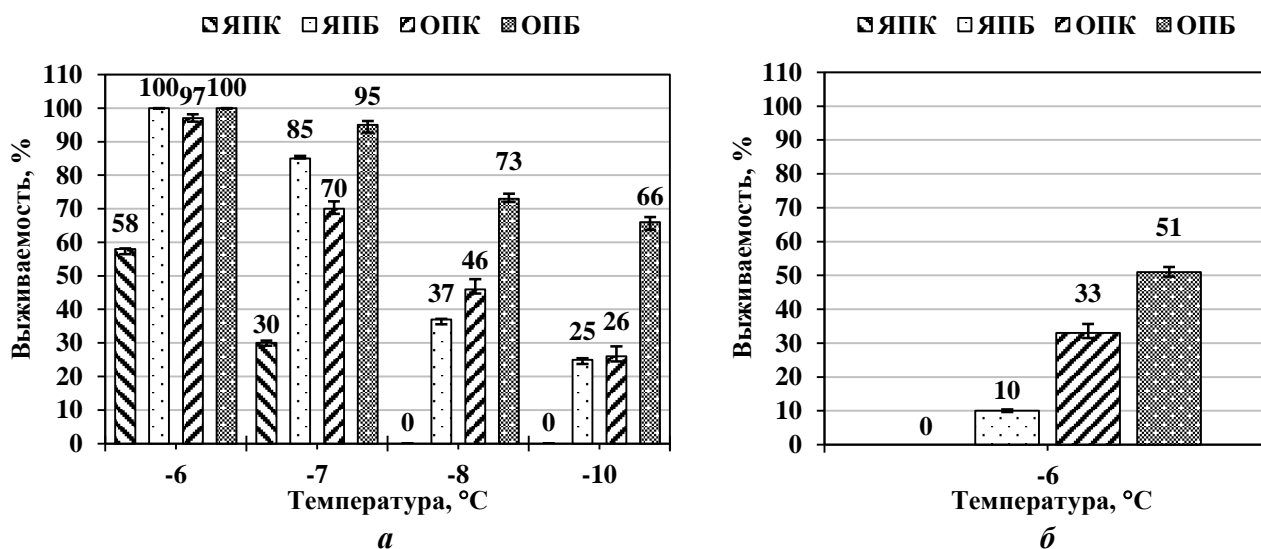


Рис. 6. Влияние препарата «Бункер» на холодо- и морозоустойчивость холодозакалённых (а) и раззакалённых (б) проростков злаков

Примечание: n=6. Ме [25%;75%]. Температурные условия (см. «Материалы и методы»).

Обозначения: ЯП, ОП – как на рис. 1; К и Б – как на рис. 2.

При температуре $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ выживаемость проростков озимой пшеницы из обработанных семян была выше, чем у контрольных растений в 2,5 раза (рис. 6а). Температуры $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ были летальными для закалённых проростков яровой пшеницы из необработанных семян, тогда как проростки из семян, обработанных препаратом «Бункер», выживали (рис. 6а). Раззакаливание существенно снижало

выживаемость проростков яровой и озимой пшеницы при последующем действии отрицательной температуры, однако выживаемость раззакалённых проростков из обработанных семян превышала таковую у контрольных растений (рис. 6б).

Таким образом, обработка семян тебуконазол-содержащим препаратом «Бункер» вызывала ингибирование ростовых процессов и более эффективное формирование механизмов низкотемпературной адаптации, что сопровождалось повышением холодо- и морозоустойчивости менее устойчивых, по сравнению с озимой рожью, злаков.

3.4. Влияние ростиингибирующих соединений на окислительную и фосфорилирующую активность митохондрий пшеницы

Митохондрии играют важную роль в механизмах адаптации растений к низким температурам (Грабельных и др., 2014б). Для изучения влияния тебуконазол-содержащего препарата «Бункер» и тебуконазола на энергетические параметры растительных митохондрий анализировали скорости дыхания в состояниях 3 и 4, КДК и отношение АДФ:О в митохондриях из побегов этиолированных проростков озимой пшеницы, окисляющих различные субстраты (данные по КДК и отношению АДФ:О представлены в диссертации, гл. 3.4). Применяли концентрацию тебуконазола (1 мМ), которая приводила к сходному с препаратом «Бункер» (1,5 мкл/г семян) ингибированию длины колеоптилей побегов проростков изученных злаков (данные представлены в диссертации, гл. 3.1.1). Обработка проростков озимой пшеницы тебуконазолом в контрольных условиях сопровождалась снижением скоростей дыхания и КДК в изолированных из них митохондриях при окислении малата (рис. 7а).

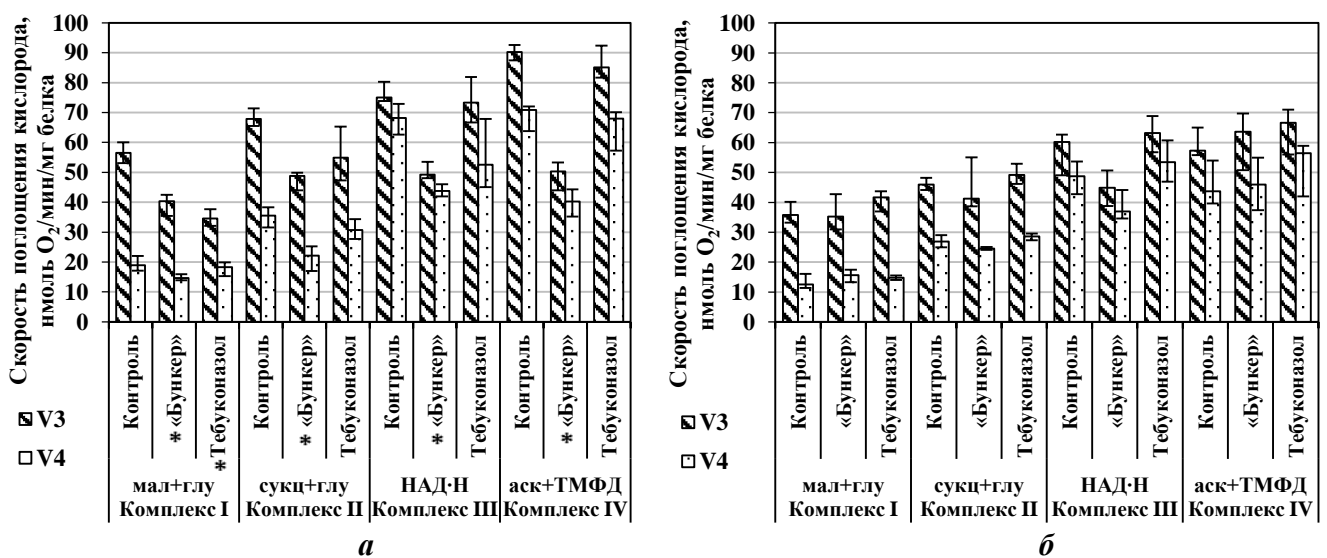


Рис. 7. Влияние препарата «Бункер» и тебуконазола на окислительную активность митохондрий озимой пшеницы из побегов этиолированных проростков, выращенных в контрольных условиях (а), и после холодого закаливания (б)

Примечание: температурные условия, концентрация субстратов окисления (см. «Материалы и методы»). Комплексы I, II, III, IV – комплексы электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий. $n=4$. Ме [25%;75%]. * – различия между вариантом Контроль и исследуемым вариантом статистически значимы.

Обозначения: Контроль (К) и «Бункер» (Б) – как на рис. 2; Тебуконазол – митохондрии из побегов проростков, выращенных в течение 2 суток в отсутствие обработок и 1 сутки на растворе 1 мМ тебуконазола; V3 – скорость фосфорилирующего дыхания; V4 – скорость нефосфорилирующего дыхания.

Данный эффект тебуконазола может объясняться тем, что фунгициды, в том числе триазольной природы, являются ингибиторами митохондриального дыхания, действуя на комплекс I дыхательной цепи (Сафина-Осташевская и Гордон, 1984). В то же время обработка семян озимой пшеницы препаратом «Бункер» ингибировала скорости дыхания изолированных из них митохондрий не только при окислении малата, но и ряда других субстратов (рис. 7а). При этом снижение скорости фосфорилирующего дыхания митохондрий при окислении малата сопровождалось падением КДК.

Последующее холодное закаливание обработанных тебуконазолом проростков приводило к незначительной стимуляции дыхания выделенных из них митохондрий независимо от использованного субстрата окисления (рис. 7б). У закалённых проростков озимой пшеницы из семян, обработанных препаратом «Бункер», тенденцию к увеличению скоростей дыхания митохондрий наблюдали при окислении малата и аскорбата с ТМФД, а при окислении сукцината и НАД·Н происходило снижение скоростей дыхания митохондрий (рис. 7б).

Поскольку тебуконазол и препарат «Бункер» оказывали влияние на окислительную активность митохондрий, было изучено изменение вклада цитохромного и альтернативного путей в дыхание митохондрий после обработки данными препаратами (рис. 8).

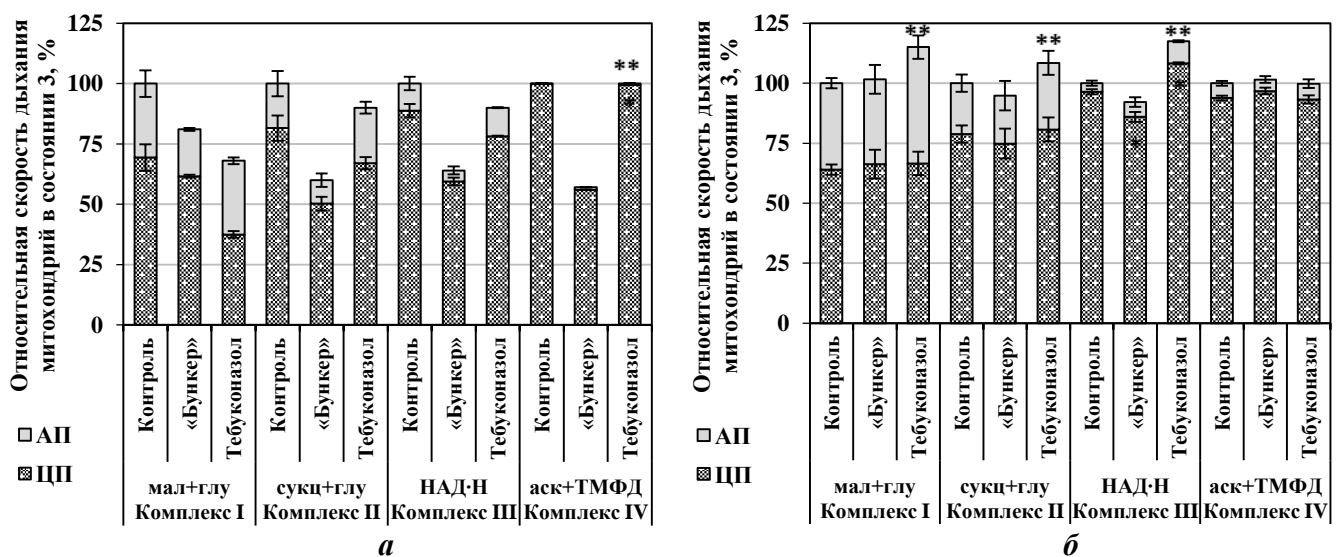


Рис. 8. Влияние препарата «Бункер» и тебуконазола на вклад цитохромного (ЦП) и альтернативного (АП) путей переноса электронов в дыхание митохондрий озимой пшеницы из побегов этиолированных проростков, выращенных в контрольных условиях (а), и после холодного закаливания (б)

Примечание: температурные условия, концентрация субстратов окисления, Комплексы I, II, III, IV – как на рис. 7. $n=4$. $M \pm S.D.$ * (ЦП), ** (АП) – различия между вариантом К и исследуемым вариантом статистически не отличаются (а), значимы (б). За 100% принята скорость фосфорилирующего дыхания при окислении субстрата митохондриями проростков из необработанных семян.

Обозначения: Контроль, «Бункер», Тебуконазол – как на рис. 7.

Оказалось, что обработка проростков тебуконазолом значительно снижала вклад ЦП в дыхание митохондрий при окислении малата, в меньшей степени – при окислении сукцината и НАД·Н и не влияла на вклад ЦП при окислении аскорбата+ТМФД (рис. 8а). Вклад АП в дыхание митохондрий, оцениваемый по

потенциальной активности АО, при этом не изменялся. В отличие от тебуконазола, обработка семян препаратом «Бункер» приводила к снижению вклада в дыхание изолированных из проростков митохондрий как ЦП, так и АП независимо от использованного субстрата окисления (рис. 8а).

Холодовое закаливание обработанных тебуконазолом проростков сопровождалось увеличением вклада АП в дыхание изолированных из побегов митохондрий при окислении ими малата и сукцината, при этом вклад ЦП в дыхание оставался на прежнем уровне. При окислении НАД·Н наряду с увеличением вклада АП происходило увеличение ЦП (рис. 8б). Изменения, наблюдаемые в митохондриях, изолированных из побегов закалённых проростков, выращенных из семян, обработанных препаратом «Бункер», касались статистически значимого снижения вклада ЦП и незначительного увеличения вклада АП в дыхание митохондрий, окисляющих НАД·Н (рис. 8б). При окислении аскорбата+ТМФД не происходило значимого изменения вклада ЦП и АП в дыхание митохондрий как из побегов проростков, обработанных тебуконазолом, так и выращенных из семян, обработанных препаратом «Бункер» (рис. 8б).

Таким образом, тебуконазол-содержащий препарат «Бункер» и тебуконазол оказывают влияние на окислительную и фосфорилирующую активность растительных митохондрий, а также на изменение потока электронов по ЦП и АП. Ингибирование скорости окисления субстратов в митохондриях под действием тебуконазола и тебуконазол-содержащего препарата может объяснять более медленное расходование сахаров в процессе роста побегов злаков (рис. 4) и может быть одним из факторов повышения холодо- и морозоустойчивости злаков (рис. 6). Выявленные различия в действии тебуконазол-содержащего препарата «Бункер» и тебуконазола свидетельствуют о том, что влияние промышленного препарата «Бункер» на параметры митохондрий опосредовано не только входящим в его состав тебуконазолом, но и вспомогательными соединениями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Низкотемпературное закаливание травянистых растений направлено на предотвращение образования внутриклеточного льда и избыточного обезвоживания, вызванного внеклеточным льдом. Смещение гормонального баланса в сторону увеличения ингибиторов роста (АБК) приводит к приостановке ростовых процессов растений (Трунова, 2007; Титов и Таланова, 2011). Увеличение проницаемости мембран достигается повышением степени ненасыщенности ЖК мембранных липидов, снижением содержания стероидов. Показано, что АБК может приводить к усилению активности десатураз и, следовательно, к увеличению содержания ПНЖК (Bakht et al., 2006). Обезвоживание предотвращается повышением осмотического потенциала клетки при увеличении содержания криопротекторных веществ, например, сахаров и белков. Белки-дегидрины проявляют криопротекторную и антифризную активности, предотвращают дегградацию и коагуляцию ряда макромолекул клеточных структур при обезвоживании (Close, 1997; Rorat, 2006; Hara, 2010). Синтез ряда дегидринов (Шакирова и др., 2009; Таланова и др., 2011; Титов и Таланова, 2011; Theocharis et al., 2012) и накопление сахаров (Kerepesi et al., 2004; Liu et al., 2013) имеют АБК-

зависимый характер. Накоплению сахаров при закаливании способствует сниженная интенсивность дыхания на фоне сохраняющегося фотосинтеза (Климов, 1998). Внезапное повышение температуры в результате оттепелей поздней зимой может вызвать раззакаливание зимующих растений, при этом морозостойкость снижается всего за несколько дней (Chen and Li, 1980). Последующее понижение температуры приводит к гибели раззакалённых растений. Раззакаливание становится необратимым, когда растения трогаются в рост (Чиркова, 2002; Eagles and Williams, 1992; Rapacz, 2002; Kalberer et al., 2006). Предположительно, если затормозить переход к активной вегетации при резком временном повышении температуры, растения выживут при последующих заморозках. Поэтому в районах с неустойчивой погодой в период поздней зимы и ранней весны будет целесообразней возделывать сорта с более длительным периодом покоя и поздним сроком запуска раззакаливания. Удлинять продолжительность покоя способны регуляторы роста растений. При этом для повышения морозостойкости растений в ранневесенний период могут быть эффективны регуляторы роста, обладающие ретардантными свойствами. Как показал анализ данных, имеющихся в литературе, такими свойствами обладают фунгициды триазольной природы. Имеются сведения о способности некоторых представителей данных соединений повышать устойчивость растений к низким температурам (Прусакова и Чижова, 1998). Механизмы повышения устойчивости при применении этих препаратов изучены недостаточно, предположительно они связаны с влиянием триазолов на синтез АБК (Павлова, 2003; Чижова и др., 2005). Как известно, повышение содержания АБК является необходимым звеном механизма низкотемпературной адаптации. Кроме того, триазолы являются ингибиторами синтеза стероидов, в том числе у растений (Попов и др., 2003; Benton and Cobb, 1997). Поскольку производные триазола могут приводить к увеличению содержания АБК, от которой зависит синтез стрессовых белков, накопление водорастворимых углеводов и десатурация НЖК мембранных липидов, то обработка триазолами, возможно, приведёт к повышению морозоустойчивости растений и к поддержанию свойств морозоустойчивости в период раззакаливания.

Для проверки выдвинутой нами гипотезы использовали тебуконазол-содержащий протравитель семян (содержание тебуконазола 60 г/л) – системный фунгицид профилактического и лечебного действия, а в качестве объектов исследования – этиолированные проростки злаков с разной устойчивостью к низкой температуре: высоко морозо- и зимостойкая озимая рожь, менее морозо- и зимостойкая озимая пшеница и холодостойкая яровая пшеница.

В лабораторных условиях подтвердилось, что обработка семян тебуконазол-содержащим протравителем приводит к повышению холодо- и морозоустойчивости яровой и озимой пшеницы (рис. 6) за счёт влияния препарата на ростовые процессы проростков, углеводный, белковый, жирнокислотный и дыхательный метаболизмы (см. 3.1, 3.2, 3.4).

Обработка семян злаков протравителем оказывала концентрационно-зависимый ингибирующий эффект на рост проростков (рис. 1а), не сопровождающийся гибелью клеток колеоптилей (рис. 1б).

Ретардантное действие тебуконазол-содержащего препарата сопровождалось увеличением степени ненасыщенности ЖК побегов этиолированных проростков злаков. При этом, главным образом, происходило снижение содержания пальмитиновой кислоты и повышение содержания α -линоленовой кислоты (рис. 2), наблюдалось повышение показателя ИДС и отношения $\Sigma_{\text{ННЖК}}/\Sigma_{\text{НЖК}}$. Как известно, наблюдаемые изменения направлены на поддержание текучести мембран клеток в период действия низких температур (Хочачка и Сомеро, 1988).

Повышение холодо- и морозоустойчивости исследуемых злаков сопровождалось синтезом низкомолекулярных дегидринов. При этом обработка тебуконазол-содержащим протравителем семян индуцировала в побегах яровой и озимой пшеницы синтез новых низкомолекулярных дегидринов, сохраняющихся после раззакаливания данных злаков (рис. 3а, б). По литературным данным за формирование морозоустойчивости у древесных растений отвечают низкомолекулярные дегидрины (Петров и др., 2011; Пономарев и др., 2014). В нашем исследовании обнаруженные после обработки препаратом низкомолекулярные дегидрины, скорее всего, также участвуют в повышении холодо- и морозоустойчивости, поскольку обработка семян тебуконазол-содержащим препаратом увеличивала выживаемость проростков злаков после действия отрицательных температур (рис. 6).

В работе наблюдалась положительная связь между содержанием водорастворимых углеводов в тканях исследуемых злаков и их холодо- и морозоустойчивостью. Содержание сахаров так же, как и содержание α -линоленовой кислоты, повышалось в ряду: яровая пшеница – озимая пшеница – озимая рожь (рис. 4). В тканях побегов проростков исследуемых злаков из семян, обработанных тебуконазол-содержащим протравителем, содержание сахаров было выше как при нормальных температурных условиях, так и при холодном закаливании (рис. 4). В проростках озимой пшеницы из обработанных семян наблюдалось более экономное расходование сахаров в процессе роста (рис. 4б).

Обработка семян озимой пшеницы тебуконазол-содержащим протравителем приводила к поддержанию интенсивности дыхания тканей побегов проростков при раззакаливании на уровне дыхания закалённых растений (рис. 5б), в то время как у контрольных растений при раззакаливании дыхание резко возрастало (рис. 5а). Резкое увеличение интенсивности дыхания у озимой пшеницы в естественных условиях, например при наступлении оттепелей (Поморцев и др., 2014), приводит к быстрому раззакаливанию растений, что является одной из главных причин их гибели при возобновлении отрицательных температур (Дорофеев и др., 2004).

На изолированных митохондриях озимой пшеницы было показано, что в контрольных условиях тебуконазол значительно снижал скорость окисления малата (рис. 7а). Ингибирование скорости дыхания митохондрий наблюдали и после обработки семян тебуконазол-содержащим протравителем, однако в этом случае действие препарата было направлено в целом на скорость переноса электронов по ЭТЦ, поскольку не было обнаружено явных различий в скоростях окисления используемых субстратов (рис. 7а). Как оказалось, тебуконазол при окислении митохондриями малата ингибирует ЦП, в то время как тебуконазол-

содержащий протравитель подавлял транспорт электронов при окислении изученных субстратов как через ЦП, так и АП (рис. 8а). Тебуконазол, как и тебуконазол-содержащий препарат, приводил к некоторому усилению окислительной активности митохондрий из холодозакалённых растений (рис. 7б), что может объясняться необходимостью обеспечения синтетических процессов в клетке при закаливании растений. Усиление дыхания митохондрий происходило за счёт увеличения вклада АП, связанного с функционированием АО, главным образом при окислении малата (рис. 8б). АО, как известно, необходима для адаптации растений к низким температурам (Грабельных и др., 2014б).

Исходя из имеющихся в литературе данных и полученных в работе результатов, можно предположить следующую цепь событий, происходящих в клетках злаков при обработке тебуконазолом. Тебуконазол, являясь производным 1,2,4-триазола, действует на уровне фермента цитохром Р450-монооксигеназы, катализирующего синтез ГК₁₂ (гибберелловой кислоты – общего предшественника других ГБ) из энт-каурена. Ингибирование данного фермента приводит к подавлению синтеза ГБ и переключению метаболического изопреноидного пути на синтез АБК из мевалоновой кислоты (общего предшественника для синтеза ГБ и АБК) (Vettakkorumakankav et al., 1999). Подавление синтеза ГБ и увеличение содержания АБК приводит к торможению ростовых процессов осевых органов растений (Трунова, 2007; Титов и Таланова, 2011). Накопление АБК – основного стрессового гормона растений – запускает синтез стрессовых белков, в том числе АБК-зависимых дегидринов (Шакирова и др., 2009; Таланова и др., 2011; Титов и Таланова, 2011; Theocharis et al., 2012), и накопление водорастворимых углеводов (Kerepesi et al., 2004; Liu et al., 2013), которые в свою очередь также могут усиливать синтез дегидринов (Боровик, 2015). Увеличение содержания АБК может приводить к усилению активности десатураз, что приводит к увеличению содержания ПНЖК (Bakht et al., 2006). Являясь ингибитором синтеза стерина (Попов и др., 2003; Benton and Cobb, 1997), тебуконазол повышает текучесть клеточных мембран, в первую очередь плазмалеммы. Тебуконазол подавляет ЦП на уровне комплекса I дыхательной цепи митохондрий, при этом снижение дыхания позволяет экономить субстраты – сахара. Тебуконазол, активируя ферментативные и неферментативные антиоксидантные системы, может приводить к снижению содержания активных форм кислорода, образующихся при низкотемпературном стрессе (Kraus and Fletcher, 1994).

Все рассмотренные механизмы направлены на повышение устойчивости растений к отрицательной температуре. Повышенное содержание сахаров, дегидринов, ПНЖК, более поздняя активация дыхания позволяют дольше сохранять свойства морозоустойчивости, что особенно актуально для озимой пшеницы в условиях резко-континентального климата Восточной Сибири. Таким образом, полученные нами данные расширяют перспективы для выращивания озимой пшеницы в регионах с нестабильным температурным режимом в позднелетний и ранневесенний периоды.

ВЫВОДЫ

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

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

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

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

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

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в периодических изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Роль активных форм кислорода и участие митохондрий в развитии программируемой клеточной гибели в coleoptilyах озимой пшеницы / **А. В. Корсукова**, О. И. Грабельных, И. В. Любушкина, Т. П. Побежимова, Н. А. Королева, Н. С. Павловская, И. В. Федосеева, В. К. Войников // Известия Иркутского государственного университета. Серия «Биология. Экология». – 2013. – Т. 6, № 2. – С. 14–26.

2. The tebuconazole-based protectant of seeds “Bunker” induces the synthesis of dehydrins during cold hardening and increases the frost resistance of wheat seedlings / **A. V. Korsukova**, O. A. Borovik, O. I. Grabelnych, V. K. Voinikov // Journal of Stress Physiology and Biochemistry. – 2015. – V. 11, N 4. – P. 118–127.

3. Повышение холодостойкости проростков яровой пшеницы при обработке семян тебуконазолом / **А. В. Корсукова**, О. А. Боровик, О. И. Грабельных, Н. В. Дорофеев, Т. П. Побежимова, В. К. Войников // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2015, № 4 (15). – С. 30–36.

4. Влияние обработки семян тебуконазолом на содержание сахаров и морозоустойчивость озимой пшеницы и ржи / **А. В. Корсукова**, О. И. Грабельных, О. А. Боровик, Н. В. Дорофеев, Т. П. Побежимова, В. К. Войников // Агрохимия. – 2016 (принята в печать).

Статьи в других рецензируемых журналах и материалах конференций

5. Тебуконазол влияет на дыхательный метаболизм митохондрий и устойчивость этиолированных проростков яровой пшеницы к низкой температуре / **А. В. Корсукова**, О. И. Грабельных, О. А. Боровик, Н. В. Дорофеев, Т. П. Побежимова, В. К. Войников // Механизмы регуляции функций растительных органелл : материалы Всероссийской научной конференции. – Иркутск: НЦРВХ СО РАМН, 2014. – С. 43–45.
6. Возможность использования фунгицидов – производных триазола для повышения морозоустойчивости злаков / **А. В. Корсукова**, О. И. Грабельных, О. А. Боровик, Н. В. Дорофеев // Вестник Иркутского университета. – Иркутск : Изд-во ИГУ, 2015. – вып. 18. – С. 24–25.
7. Влияние тебуконазол-содержащего препарата Бункер на морозоустойчивость яровой и озимой пшеницы / **А. В. Корсукова**, О. И. Грабельных, О. А. Боровик, Н. В. Дорофеев, Т. П. Побежимова, В. К. Войников // Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий : тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием и школы для молодых ученых. – Петрозаводск : Карельский научный центр РАН, 2015. – С. 277.

Список сокращений

АБК – абсцизовая кислота

АО – альтернативная антимицин А- и цианид-резистентная оксидаза

АП – альтернативный путь дыхания, связанный с функционированием АО

БГК – бензгидроксамовая кислота

ГБ (ГК) – гиббереллины (гибберелловая кислота)

ЖК – жирные кислоты

ИДС – индекс двойной связи

МЭЖК – метиловые эфиры жирных кислот

НЖК (ННЖК) – насыщенные (ненасыщенные) жирные кислоты

ТМФД – тетраметил-п-фенилендиамин

ТТХ – 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид

ЦП – цитохромный путь дыхания, связанный с функционированием цитохромоксидазы

ЭТЦ – электрон-транспортная цепь

DMSO (dimethyl sulfoxide) – диметилсульфоксид

LSD (Least Significant Difference) – метод группирования выборок с наименьшей значимой разностью

SDS-PAGE – денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия