

ФАНО России
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр Российской академии наук»
(КарНЦ РАН)

На правах рукописи

ИГНАТЕНКО Анна Анатольевна

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах научно - квалификационной работы (диссертации)
на тему: **«Участие антиоксидантной системы в защитных реакциях
контрастных по устойчивости растений на действие низких температур и
регуляция ее активности фитогормонами»,**
подготовленной в соответствии с требованиями
Федерального государственного образовательного стандарта
высшего образования по направлению 06.06.01. Биологические науки
(уровень подготовки кадров высшей квалификации)

Научный руководитель:
г.н.с., д.б.н., с.н.с. В.В. Таланова

Петрозаводск 2018

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. В течение жизни растения постоянно или периодически подвергаются действию неблагоприятных абиотических факторов, среди которых одним из основных, особенно в условиях Севера, является низкая температура (Титов, Таланова, 2009). Она влияет на анатомо-морфологические особенности растений, их физиологические процессы (рост, развитие, фотосинтез, дыхание, транспирацию, водообмен), а также определяет их географическое распространение. В связи с этим изучение механизмов устойчивости и адаптации растений к действию низких температур является одной из приоритетных задач современной физиологии растений. Известно, что характер ответных реакций растений может различаться в зависимости от интенсивности и характера температурного воздействия (краткосрочное или длительное) (Титов, Таланова, 2009). В то же время до сих пор отсутствует однозначный ответ на вопрос о том, одни и те же или разные механизмы лежат в основе повышения устойчивости к низкотемпературным воздействиям, различающимся по интенсивности и продолжительности.

Особый интерес представляют исследования, посвященные изучению механизмов адаптации с использованием контрастных по устойчивости к низким температурам растений (холодоустойчивые и теплолюбивые). К настоящему времени в меньшей степени изучены особенности низкотемпературной адаптации теплолюбивых видов, в то время как такие исследования могут иметь прикладное значение – повышение эффективности сельскохозяйственного производства в регионах рискованного земледелия.

Важнейшим защитным механизмом при действии стресс-факторов разной природы считается активизация многокомпонентной антиоксидантной системы (АОС) (Noctor et al., 2012). При этом, несмотря на обширную литературу, посвященную работе АОС в условиях низких температур, многие особенности ее функционирования остаются не до конца изученными. Так, например, до сих пор отсутствует единая точка зрения о том, какие из компонентов АОС (антиоксидантные ферменты или низкомолекулярные соединения) вносят бóльший вклад в утилизацию активных форм кислорода (АФК) при охлаждении. Кроме

того, в известной нам литературе практически отсутствуют исследования, в которых одновременно изучена активность АОС на примере контрастных по холодоустойчивости видов.

Другой важной проблемой при изучении ответной реакции растений является выявление регуляторных механизмов функционирования АОС в условиях действия низких температур. За последние десятилетия накоплен обширный материал об участии фитогормонов в повышении устойчивости растений к низким температурам (Janda et al., 1999; Тарчевский, 2001; Титов, Таланова, 2009; Theocharis et al., 2012; Kazan, 2015). При этом ряд авторов указывают на то, что важный вклад в формирование устойчивости вносит индуцируемая фитогормонами активизация АОС. Наряду с классическими, «неклассическим» гормонам, таким как салициловая кислота (СК) и жасмонаты чаще всего уделяют внимание как фитогормонам, участвующим в повышении устойчивости растений к повреждению патогенами и насекомыми-фитофагами (Васюкова, Озерцовская, 2007; Metraux, 2002; Медведев, 2013; Wasternack, 2014). С другой стороны, работы последних лет указывают на их вовлечение в ответ растений на засоление, засуху, высокие температуры, тяжелые металлы, а также низкие температуры (Shakirova et al., 2013; Kang et al., 2014; Miura, Tada, 2014; Dar et al. 2015; Kazan, 2015). При этом имеются сведения о том, что обработка растений СК и эфиром жасмоновой кислоты – метилжасмонатом (МЖ) может приводить к повышению активности антиоксидантных ферментов и индуцирует накопление транскриптов их генов (Janda et al., 2014; Khan et al., 2015). Однако такие исследования немногочисленны и противоречивы.

В связи с этим, **цель настоящей работы** состояла в выявлении участия антиоксидантной системы в защитных реакциях контрастных по устойчивости растений на действие низких положительных температур и регуляция ее активности фитогормонами.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Оценить реакцию контрастных по устойчивости растений (пшеница и огурец) на низкотемпературные воздействия, различные по интенсивности и продолжительности.

2. Изучить влияние низкотемпературных воздействий на уровень окислительного стресса (накопление перекиси водорода и малонового диальдегида) в листьях контрастных по устойчивости растений.

3. Исследовать функционирование компонентов антиоксидантной системы (активность антиоксидантных ферментов и накопление транскриптов их генов, уровень низкомолекулярных соединений) в листьях пшеницы и огурца при действии низких температур.

4. Изучить влияние экзогенных фитогормонов (СК и МЖ) на устойчивость растений пшеницы и огурца к низкотемпературным воздействиям, различным по интенсивности и продолжительности.

5. Исследовать влияние СК и МЖ на уровень окислительного стресса в листьях контрастных по устойчивости растений в условиях действия низких температур.

6. Изучить влияние СК и МЖ на активность антиоксидантных ферментов, содержание транскриптов их генов и уровень свободного пролина в листьях пшеницы и огурца, подвергнутых воздействию низких температур.

Научная новизна работы. Впервые проведенное комплексное исследование физиолого-биохимических и молекулярно-генетических показателей растений, контрастных по холодоустойчивости, с одновременной оценкой динамики устойчивости к низким температурам, показало, что активизация АОС является общим защитным механизмом растений как при кратковременном, так и на длительном действии низких положительных температур. Впервые показано, что образующаяся в клетках пшеницы и огурца перекись водорода при кратковременных низкотемпературных воздействиях утилизируется с участием каталазы и пероксидазы, а при более продолжительных – нейтрализуется в основном пероксидазой. С использованием низкотемпературных воздействий, различающихся по интенсивности, показано, что ферментные компоненты АОС участвуют в повышении устойчивости растений в течение всего периода действия закаливающих температур и на начальных этапах действия повреждающей температуры.

Впервые на примере двух объектов (пшеницы и огурца) показано, что предобработка растений салицилатом (100 мкМ) или метилжасмонатом (1 мкМ) обеспечивает преадаптацию проростков к последующим низкотемпературным

воздействиям. Экспериментально доказано, что предобработка этими фитогормонами в нормальных температурных условиях вызывает некоторое усиление перекисного окисления липидов; при этом СК повышает в клетках растений содержание перекиси водорода и МДА, а МЖ – только МДА. Показано, что экзогенные фитогормоны (СК и МЖ) в условиях действия низких температур приводят к активизации АОС и снижению уровня окислительного стресса, что способствует сохранению функциональной стабильности мембран и благоприятствует формированию повышенной холодоустойчивости. Получены новые данные о влиянии экзогенных фитогормонов на накопление транскриптов генов *MnSOD*, *Cu/ZnSOD*, *FeSOD*, *CAT*, кодирующих антиоксидантные ферменты. Выявлено, что СК, по сравнению с МЖ, вызывает большее повышение активности пероксидазы и накопление свободного пролина в листьях растений при действии закаливающих температур, а МЖ в этих условиях в большей степени увеличивает активность супероксиддисмутазы и каталазы.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в работе данные о функционировании АОС в листьях растений при действии низких температур имеют важное значение для углубления и расширения имеющихся в настоящее время знаний о механизмах адаптации растений к действию этого стресс-фактора. Полученные данные о разной ответной реакции растений на низкотемпературные воздействия, различающиеся по своей интенсивности и продолжительности, позволяют углубить знания об адаптационных возможностях растений. Результаты работы имеют фундаментальный и прикладной характер, и могут быть рекомендованы к использованию в селекции (получение новых сортов сельскохозяйственных культур с повышенной устойчивостью к низким температурам). Полученные данные о влиянии «неклассических» фитогормонов (СК и МЖ) на холодоустойчивость, активность антиоксидантных ферментов и уровень свободного пролина вносят значительный вклад в понимание механизмов регуляции компонентов АОС при адаптации растений к низким температурам. Кроме того, полученные результаты могут быть использованы при разработке новых биотехнологий, связанных с применением синтетических фиторегуляторов для повышения стрессоустойчивости сельскохозяйственных культур, особенно при их выращивании в регионах с неблагоприятными природно-

климатическими условиями. Результаты исследований могут быть использованы в курсах лекций для студентов биологических и сельскохозяйственных специальностей.

Личное участие автора. Автор лично принимал участие в планировании и проведении экспериментальной работы, в статистической обработке, обобщении и интерпретации полученных данных, а также в написании статей, опубликованных по результатам работы и апробации результатов исследования. Научно-квалификационная работа (диссертация) написана автором самостоятельно.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы доложены на 19-й и 20-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых "Биология – наука XXI века" (Пушино, 2015, 2016), IX и X Международных симпозиумах «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2015, 2018), International conference «Plant Growth, Nutrition & Environment Interaction» (Вена, 2015), Всероссийской научной конференции с международным участием и школе для молодых ученых «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (Петрозаводск, 2015), III (XI) и IV (XII) Международных ботанических конференциях молодых ученых (Санкт-Петербург, 2015, 2018), Всероссийской научной конференции с международным участием и школе для молодых ученых "Фундаментальные и прикладные проблемы современной экспериментальной биологии растений", посвященной 125-летию Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (Москва, 2015), Всероссийской (с международным участием) научной конференции «Биологические аспекты распространения, адаптации и устойчивости растений» (Саранск, 2016), Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 70-летию КарНЦ РАН «Роль науки в решении проблем региона и страны: фундаментальные и прикладные исследования» (Петрозаводск, 2016), Fourth International Symposium on Plant Signaling and Behavior (Saint Petersburg, 2016), Годичном собрании общества физиологов растений России «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма» (Санкт-Петербург, 2016), XXIV Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов–2017" (Москва, 2017), II Международном симпозиуме "Молекулярные аспекты редокс-

метаболизма растений" (Уфа, 2017), Научной конференции и школе для молодых ученых «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты» (Судак, 2017), Международной конференции YOUNG BIOLOGISTS SCIENCE WEEK-2017 (Петрозаводск, 2017), II Международной научно-практической конференции «Клеточная биология и биотехнология растений» (Минск, 2018), XIV Делегатском съезде РБО и научной конференции «Ботаника в современном мире» (Махачкала, 2018), SEB's Annual Meeting (Florence, 2018), 43rd FEBS Congress (Prague, 2018).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 30 работ, из них 6 статей – в рецензируемых журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК.

Работа выполнена в Лаборатории экологической физиологии растений Института биологии – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук» с использованием оборудования Центра коллективного пользования Института биологии КарНЦ РАН «Комплексные фундаментальные и прикладные исследования особенностей функционирования живых систем в условиях Севера».

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объекты исследований. В качестве модельных объектов исследований использовали растения озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39 и огурца (*Cucumis sativus* L.) гибрида F1 Зозуля.

Пшеница сорта Московская 39 относится к типичным представителям холодоустойчивых растений, а огурец – теплолюбивых растений.

Растения выращивали в течение 7 сут в рулонах фильтровальной бумаги на питательном растворе в климатической камере при постоянных условиях среды: температуре воздуха 22°C, относительной влажности 60–70%, освещенности ФАР 180 мкмоль/м²·с и 14 ч фотопериоде.

Обработку растений фитогормонами проводили, помещая их на растворы СК (100 мкМ) и МЖ (1 мкМ) и через 24 ч подвергали действию низких положительных температур. Выбор концентраций гормонов основан на результатах предварительных экспериментов. В качестве контроля использовали необработанные гормонами растения.

Действие низких температур на растения осуществляли в камерах искусственного климата. Растения пшеницы в течение 7 сут подвергали действию низкой закаливающей температуры 4°C, а проростки огурца в течение 3 сут – низкой закаливающей (12°C) и повреждающей (4°C) температуры. Выбор температур основан на результатах предыдущих исследований (Титов и др., 2006; Титов, Таланова, 2009). Все измерения проводили на первом листе проростков пшеницы и семядольных листьях огурца.

Устойчивость растений пшеницы оценивали по реакции палисадных клеток высечек из листьев на 5-минутное тестирующее промораживание в микрохолодильнике (Балагурова и др., 1982). В качестве критерия устойчивости использовали температуру гибели 50% паренхимных клеток (ЛТ₅₀).

Проницаемость мембран клеток определяли с использованием кондуктометра по выходу электролитов из высечек листьев огурца (Гришенкова, Лукаткин, 2007).

Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) в листьях оценивали по накоплению продукта его реакции – малонового диальдегида (МДА) с тиобарбитуровой кислотой (Stewart, Bewley, 1980).

Определение содержания перекиси водорода проводили согласно методу, основанному на окислении перекисью водорода ионов железа, образующих с ксиленоловым оранжевым окрашенные соединения (Bellincampi et al., 2000).

Определение активностей антиоксидантных ферментов проводили спектрофотометрически. Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по способности фермента ингибировать восстановление нитросинего тетразолия до формазана (Beauchamp, Fridovich, 1971). Активность каталазы (КАТ) определяли по разложению H_2O_2 при 240 нм (Aebi, 1984; Никерова и др., 2016), а пероксидазы – по увеличению оптической плотности в результате окисления гваякола при 470 нм (Maehly, Chance, 1954).

Содержание белка оценивали методом Бредфорда (Bradford, 1976).

Для определения содержания свободного пролина использовали метод Бейтса (Bates et al., 1973).

Накопление транскриптов генов анализировали методом ПЦР в режиме реального времени и вычисляли по формуле.

Повторности и статистическая обработка результатов. Повторность в пределах каждого варианта опыта 3–6-кратная. Каждый опыт повторяли не менее 3 раз. Статистическую обработку данных осуществляли в среде Microsoft Excel. Данные представляли в виде средней арифметической, а разброс значений – в виде стандартной ошибки. Для доказательства значимых различий между средними использовали t-критерия Стьюдента и однофакторный дисперсионный анализ с последующим сравнением средних по методу LSD (Least Significant Difference). Различия между данными считали статистически значимыми при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Реакция растений, контрастных по холодоустойчивости на низкотемпературные воздействия разной интенсивности

В научно-квалификационной работе (диссертации) установлено, что характер изменения физиолого-биохимических показателей меняется количественно и качественно в зависимости от вида растения, интенсивности и продолжительности низкотемпературного воздействия. Так, устойчивость холодоустойчивого вида (пшеница) при температурах 12 и 4°C повышалась в течение всего низкотемпературного воздействия. При этом, при 12°C она увеличивалась после суточной экспозиции, а затем практически не изменялась. В отличие от этого, при 4°C устойчивость к промораживанию начинала повышаться уже в первые часы закаливания и продолжала возрастать, достигая максимума на 6-7 сут.

Адаптивные возможности теплолюбивых видов, по сравнению с холодостойкими, крайне ограничены (Титов и др., 2006; Титов, Таланова, 2009), большинство из них повреждается при температурах ниже 10°C (Попов и др., 2010; Jouyban et al., 2013). Однако в определенном диапазоне температур они способны к низкотемпературному закаливанию. Так, нами показано, что низкая температура 12°C вызывала слабое повышение выхода электролитов из клеток листьев огурца, который затем снижался, что указывает на то, что эта температура оказывает на растения закаливающий эффект. В отличие от этого, при 4°C выход электролитов увеличивался в течение всего опыта, что указывает на необратимое повреждение мембранной системы и снижение устойчивости растения в целом.

Известно, что воздействие неблагоприятных факторов среды вызывает усиление генерации активных форм кислорода (АФК) в клетках растений, что приводит к развитию окислительного стресса (Kreslavski et al., 2012). В листьях пшеницы при действии низкой температуры выявлено некоторое повышение уровня окислительного стресса, о котором судили по накоплению перекиси водорода и МДА – продукта ПОЛ. Однако к концу закаливания обнаружено снижение их содержания, а соответственно, и уровня окислительного стресса. Полученные данные согласуются с результатами других исследователей,

полученных на табаке, картофеле и арабидопсисе (Дерябин и др., 2003; Синькевич и др., 2009; Попов и др., 2010). В листьях огурца температура 12°C также не вызывала существенных изменений в содержании перекиси водорода и МДА. В отличие от этого, значительное повышение содержания перекиси водорода и МДА к концу действия температуры 4°C указывает на развитие окислительного стресса, что, очевидно, являлось одной из причин повреждения растений. Сходные данные об отрицательном действии низких положительных температур получены на других сортах огурца (Шаркаева, 2001; Lukatkin et al., 2003).

В клетках растений для защиты от избыточного накопления АФК функционирует АОС, включающая ферменты (СОД, КАТ, различные ПО, ферменты аскорбат-глутатионового цикла), и низкомолекулярные соединения, обладающие свойствами «ловушек» АФК (глутатион, аскорбиновая кислота, фенольные соединения, каротиноиды, пролин и др.) (Креславский и др., 2012; Колупаев и др., 2015). Первой линией защиты клеток растений от АФК является СОД, которая катализирует превращение супероксидного радикала до перекиси водорода. Механизм действия фермента заключается в последовательном восстановлении и окислении супероксидными анион-радикалами металла активного центра фермента. В листьях пшеницы при действии температуры 4°C уже через 1 ч происходило повышение активности СОД, которая в дальнейшем продолжала увеличиваться, достигая максимума на 3-7 сут. Наряду с этим происходило накопление транскриптов генов, кодирующих железосодержащую (*FeSOD*) и марганцевую (*MnSOD*) изоформы СОД. На других объектах при действии низких температур также было обнаружено повышение активности СОД (Xu et al., 2008; Радюк и др., 2009; Kolupaev et al., 2015; Репкина и др., 2017). В листьях огурца также обнаружено повышение активности СОД и накопление транскриптов ее генов в течение всего периода действия температуры 12°C. При 4°C активность фермента повышалась в первые часы опыта, однако в дальнейшем резко снижалась, что согласуется с данными, полученными на других теплолюбивых видах (Jahnke et al., 1991; Лукаткин, 2002).

К ферментам, удаляющим токсичную для клеток перекись водорода, относят КАТ. Она катализирует разложение H_2O_2 с образованием воды и выделением молекулярного кислорода. Реакция протекает с высокой скоростью, но, в то же

время, КАТ имеет низкое сродство к H_2O_2 и начинает работать при ее высоком содержании (Гарифзянов и др., 2011). Анализ активности КАТ в листьях пшеницы показал небольшое ее повышение при 4°C в течение 2 сут с последующим снижением. Сходные данные об увеличении активности КАТ в условиях действия низких температур получены другими исследователями (Radyuk et al., 2009; Sin'kevich et al., 2009). В начальный период закаливания также выявлено увеличение содержания транскриптов гена, ответственного за ее синтез, которое в дальнейшем снижалось. Повышение экспрессии генов КАТ при действии холода также наблюдали у растений баклажана (Zubini et al., 2005) и томата (Ding et al., 2002). Активность КАТ в листьях огурца повышалась в первые часы действия и закаливающей, и повреждающей температур. Однако, в дальнейшем, при 12°C активность фермента практически не изменялась, а при 4°C резко снижалась. Уменьшение активности КАТ выявлено у растений огурца и кукурузы уже через 1 ч от начала действия низкой температуры, которое в дальнейшем, при увеличении холодовой экспозиции сопровождалось нормализацией активности у кукурузы (Лукаткин, 2002). Логично предположить, что обнаруженное резкое снижение активности КАТ в листьях огурца, по-видимому, и вызывало отмеченное выше накопление перекиси водорода, что приводило к развитию окислительного стресса и повреждению клеточных мембран.

При низких концентрациях перекись водорода разлагается при участии ПО, которые используют ее в качестве окислителя. К ним относятся: НАДФН-пероксидаза, глутатион-пероксидаза, гваякол-пероксидаза, аскорбат-пероксидаза и др., отличающиеся друг от друга субстратами, которые они используют в качестве доноров водорода. В листьях пшеницы при 4°C отмечено значительное повышение активности ПО. В листьях огурца активность ПО также повышалась, хотя и в меньшей степени, на протяжении всего периода действия закаливающей температуры, в то время как при повреждающей температуре – только в первые сут, а затем снижалась. Следует отметить, что повышение активности ПО при действии низких температур обнаружено у растений овса, риса и арабидопсиса (Радюк и др., 2009; Mutlu et al., 2013; Синькевич и др., 2016). В то же время у растений ячменя и пшеницы обнаружено снижение ее активности (Загоскина и др., 2011; Mutlu et al., 2013).

Наряду с антиоксидантными ферментами в защите клеток растений от АФК принимают участие низкомолекулярные протекторные соединения, в частности, свободный пролин. Он синтезируется двумя путями – из глутамата или орнитина. Причем, синтез пролина, индуцированный действием стрессоров, происходит в основном по глутаматному пути (Liang et al., 2013). Наряду с его осмопротекторными свойствами, он является антиоксидантом и может инактивировать гидроксильные радикалы (Saradhi et al., 1995). Увеличение содержания пролина в растениях является общей физиологической реакцией на засуху, засоление, дефицит минерального питания, действие тяжелых металлов и др. (Fabro et al., 2004; Miranda et al., 2014). Отмечено накопление пролина в растениях и в ответ на действие низких температур (Luo et al., 2011; Cao et al., 2014), что согласуется с результатами, полученными в ходе нашего эксперимента: в листьях пшеницы и огурца выявлена его аккумуляция в течение всего опыта, что может свидетельствовать об его участии в ответной реакции на действие закалывающих и повреждающих температур.

Участие салициловой кислоты и метилжасмоната в защитных реакциях растений на низкотемпературные воздействия разной интенсивности

В последние годы при изучении механизмов адаптации и устойчивости растений, исследователи наряду с пятью «классическими» гормонами растений (абсцизовая кислота, гиббереллины, цитокинины, ауксины и этилен) проявляют интерес к салициловой и жасмоновой кислотам. К настоящему времени детально исследовано их участие в реакциях растений на инфицирование патогенами, в то время как роль в повышении устойчивости к факторам абиотической природы мало изучена. В связи с этим, нами было исследовано влияние СК и МЖ на ответную реакцию на действие низких температур.

Установлено, что СК и МЖ оказывают положительный эффект на холодоустойчивость растений пшеницы: у растений, предобработанных гормонами, она повышалась еще до начала действия низкой температуры, и в дальнейшем, на протяжении всего периода охлаждения, зафиксировано дополнительное увеличение холодоустойчивости по сравнению с контролем (без

обработки гормонами). Положительный эффект СК и МЖ оказывали и на холодоустойчивость растений огурца. При закаливающей температуре у этих растений выявлено снижение выхода электролитов из листьев, более выраженное под влиянием МЖ. При повреждающей температуре выход электролитов также был ниже, чем у необработанных растений. В более ранних исследованиях также было показано, что под действием экзогенной СК и МЖ у ряда растений повышалась устойчивость к холодовому повреждению (Lee et al., 1996; Janda et al., 1999; Ding et al., 2001; Kang, Saltveit, 2002; Mutlu et al., 2013).

В ряде работ показано, что СК вызывает резкое повышение уровня АФК в клетках растений, что служит сигналом для запуска защитных реакций (Kang et al., 2014; Kumar, 2014). Это подтверждается результатами наших исследований. В частности, СК ещё до начала действия низких температур значительно повышала содержание перекиси водорода в листьях пшеницы и огурца. В отличие от этого, МЖ не вызывал изменения ее уровня. Однако к концу опыта содержание перекиси водорода в листьях обработанных фитогормонами растений было ниже, по сравнению с необработанными. СК и МЖ также повышали уровень МДА до начала действия низкой температуры. В случае СК усиление окислительного стресса в листьях, скорее всего, было связано с обнаруженным нами накоплением перекиси водорода, а в случае МЖ – вызвано накоплением других АФК. В условиях низких температур в листьях обработанных фитогормонами растений уровень МДА был ниже по сравнению с необработанными в течение всего воздействия. О сходном протекторном эффекте фитогормонов посредством уменьшения содержания МДА при охлаждении ранее сообщалось и другими авторами у растений *Triticum aestivum*, *Cucumis sativus*, *Vitis vinifera*, *Oryza sativa* (Yordanova and Popova, 2007; Wang et al., 2009; Lei et al., 2010; Mutlu et al., 2013).

Уменьшение содержания перекиси водорода и МДА под влиянием экзогенных фитогормонов может свидетельствовать об их участии в защите клеток от АФК, опосредованном активизацией многокомпонентной АОС. В частности, МЖ и СК ещё до начала действия низкой температуры в листьях пшеницы повышали активность СОД. В условиях холодового закаливания фитогормоны способствовали дополнительному повышению активности СОД в течение всего периода действия температуры. Кроме того, фитогормоны усиливали накопление

транскриптов генов, кодирующих железосодержащую (*FeSOD*) и марганцевую (*MnSOD*) изоформы СОД. Отметим, что более выраженный эффект на активность СОД проявлял МЖ. В листьях огурца предобработка СК и МЖ также вызывала активизацию СОД до начала температурных воздействий и при низких температурах. Однако к концу действия повреждающей температуры даже в присутствии гормонов активность фермента снижалась. Кроме того, СК усиливала накопление транскриптов генов, кодирующих медь-цинковую (*Cu/ZnSOD*) и марганцевую (*MnSOD*) изоформы СОД в листьях огурца при действии низких закаливающей и повреждающей температур. В более ранних работах отмечалось повышение активности СОД в условиях гипотермии под влиянием экзогенной СК и МЖ у растений (Janda et al., 1999; Liu et al., 2005; Huang et al., 2016).

Взгляды исследователей на изменение активности КАТ под влиянием экзогенных фитогормонов противоречивы: они могут как повышать, так и снижать ее. В частности, ранее КАТ рассматривали в качестве основной мишени действия СК: поскольку они имеют близкие расстояния между водородными атомами гидроксильных групп – СК может связываться с активным центром КАТ, выступая в роли конкурентного ингибитора в реакции разложения H_2O_2 (Тарчевский и др., 1999). В наших исследованиях показано, что СК и МЖ повышали активность КАТ и усиливали накопление транскриптов гена, ответственного за синтез КАТ в листьях растений пшеницы, подвергнутых действию низкой температуры. Отметим, что более выраженный эффект на активность КАТ проявлял МЖ. В листьях огурца предобработка СК и МЖ также вызывала активизацию КАТ в как в нормальных условиях, так и при низкотемпературных воздействиях. Важно отметить, что, несмотря на то, что при повреждающей температуре активность КАТ снижалась, в листьях обработанных растений к концу опыта она была значительно выше, по сравнению с необработанными, что, вероятно, обуславливало более низкий уровень перекиси водорода в листьях этих растений.

Наряду с этим, предобработка растений пшеницы СК и МЖ в нормальных условиях способствовала активизации ПО и в дальнейшем, в процессе закаливания, в листьях обработанных растений активность ПО была значительно выше, чем у необработанных. При этом, на заключительных этапах холодовой адаптации в большей степени на этот фермент оказывал влияние МЖ. В листьях огурца СК и

МЖ также индуцировали активизацию ПО до начала низкотемпературных воздействий. В условиях действия низких температур этот показатель был существенно выше, чем у необработанных растений. При закаливающем температуре МЖ так же, как и у холодоустойчивого вида в бóльшей степени повышал активность ПО. Таким образом, способность фитогормонов к усилению пероксидазной активности играет важную роль в процессах холодовой адаптации, поскольку наряду с её участие в утилизации АФК, она также задействована в окислительно-восстановительных реакциях фотосинтеза, в процессах дыхания и регулировании ростовых процессов.

В ходе выполненной работы выявлено, что важный вклад в проявление протекторного действия СК и МЖ на растения пшеницы вносит их способность индуцировать накопление свободного пролина в клетках листьев. МЖ и, в бóльшей степени СК, вызывали значительное повышение уровня пролина при действии низкой температуры по сравнению с необработанными растениями. Более высокое содержание пролина было также отмечено у растений огурца, обработанных СК и МЖ, в течение всего периода действия низких температур. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли фитогормонов в поддержании жизнедеятельности растений в условиях низких температур через регуляцию содержания пролина, участвующего в процессах антиоксидантной защиты клеток растений. Механизм регуляции накопления пролина в клетках под действием фитогормонов может быть связан с повышением и/или снижением активности ферментов его синтеза и катаболизма (Misra, Saxena, 2009).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многочисленные исследования, посвященные устойчивости растений к факторам окружающей среды, показывают, что растения обладают большим количеством защитно-приспособительных реакций и механизмов, среди которых одним из важнейших является активизация АОС. На основе проведенного комплексного исследования влияния низких температур на компоненты АОС можно сделать вывод о том, что функционирование АОС является общим защитным механизмом растений в ответ как на кратковременное, так и на длительное действие низких температур. В ходе наших исследований установлено,

что низкая температура вызывает повышение активности антиоксидантных ферментов, а также усиливает накопление транскриптов кодирующих их генов. При этом при кратковременном действии низких температур активные формы кислорода утилизируются с участием каталазы и пероксидазы, а при более продолжительных – образующаяся перекись водорода нейтрализуется в основном гваяколовой пероксидазой.

Кроме того, показано, что компоненты АОС участвуют в повышении устойчивости растений к низкотемпературным воздействиям разной интенсивности. При этом при закаливающей температуре повышение активности антиоксидантных ферментов и аккумуляция пролина наблюдаются на протяжении всего воздействия, что препятствует развитию окислительного стресса и способствует повышению холодоустойчивости. В отличие от этого, при повреждающей температуре (4°C – для огурца) увеличение активности антиоксидантных ферментов выявлено только в начальный период. В дальнейшем происходило снижение их активности, что приводило к избыточному накоплению АФК, усилению процессов ПОЛ, нарушению метаболизма клеток, снижению устойчивости растений и их последующей гибели.

При анализе адаптивных реакций растений, контрастных по холодоустойчивости, на действие низких температур наше внимание было сосредоточено на участии в этих процессах экзогенных фитогормонов – салициловой кислоты и метилжасмоната. В итоге нами было обнаружено сходство в реакции растений на обработку этими фитогормонами. Так, они повышали активность антиоксидантных ферментов, индуцировали накопление транскриптов их генов и свободного пролина, что способствовало увеличению устойчивости ещё до начала действия низких температур. При этом выявлена и разница в их действии на растения: до начала низкотемпературных воздействий СК вызывала повышение содержания перекиси водорода и МДА в листьях пшеницы и огурца, в то время как МЖ увеличивал только уровень МДА. При последующем действии низких температур благодаря заблаговременной активизации АОС в листьях пшеницы и огурца происходило дополнительное повышение активности антиоксидантных ферментов и большее накопление пролина, что обеспечивало снижение уровня окислительного стресса. В случае действия закаливающих температур это

способствовало формированию повышенной холодоустойчивости растений, а при повреждающей – СК и МЖ частично нивелировало негативные последствия действия температуры на растения. Таким образом, полученные результаты об увеличении холодоустойчивости растений с помощью экзогенных фитогормонов позволяют заключить, что СК и МЖ играют важную роль в защитных реакциях растений и могут выступать в качестве эффективных индукторов устойчивости растений к низким температурам.

ВЫВОДЫ

1. Ответная реакция контрастных по холодоустойчивости растений на действие низких положительных температур имеет сходный характер, но зависит от его интенсивности и продолжительности: формирование устойчивости (при 4°C – пшеница и 12°C – огурец) или ее снижение (при длительном действии температуры 4°C – огурец).
2. Низкие положительные температуры вызывают в клетках растений пшеницы и огурца повышение уровня окислительного стресса (накопление пероксида водорода и МДА), наиболее выраженного при повреждающем воздействии.
3. У контрастных по холодоустойчивости растений в условиях действия низких закаливающих температур (пшеница, огурец) и в начальный период действия повреждающей температуры (огурец) происходит повышение антиоксидантной активности. Длительное действие повреждающей температуры приводит к ее снижению и развитию окислительного стресса.
4. Экзогенные фитогормоны (СК и МЖ) способствуют повышению холодоустойчивости растений пшеницы и огурца при закаливающих температурах и снижают негативный эффект действия повреждающей температуры.
5. Предобработка растений фитогормонами в условиях нормальной температуры вызывает временное повышение содержания H_2O_2 (под влиянием СК) и МДА (под влиянием СК и МЖ). При последующих низкотемпературных воздействиях в листьях обработанных растений происходит снижение уровня окислительного стресса по сравнению с необработанными.

6. СК и МЖ оказывают на растения пшеницы и огурца преадаптирующий эффект к действию низких температур, выраженный в активизации компонентов АОС: активность антиоксидантных ферментов, содержание мРНК их генов, а также уровень пролина под их влиянием повышается как до начала действия низких температур, так и в течение всего процесса охлаждения.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. **Фенько А.А. (Игнатенко А.А.)**, Репкина Н.С., Таланова В.В. Влияние салициловой кислоты на холодоустойчивость проростков огурца // Труды Карельского научного центра РАН. 2015. № 11. С. 26–34. ИФ РИНЦ: 0,375.
2. **Игнатенко А.А.**, Репкина Н.С., Титов А.Ф., Таланова В.В. Реакция растений огурца на низкотемпературные воздействия разной интенсивности // Труды Карельского научного центра РАН. 2016. №11. С. 57–67. ИФ РИНЦ: 0,375.
3. Репкина Н.С., **Игнатенко А.А.**, Панфилова К.М., Титов А.Ф., Таланова В.В. Динамика активности супероксиддисмутазы и экспрессия кодирующих ее генов в листьях пшеницы при холодовой адаптации // Труды Карельского научного центра РАН. 2017. №5. С. 89–98. ИФ РИНЦ: 0,375.
4. Таланова В.В., Титов А.Ф., Репкина Н.С., **Игнатенко А.А.** Влияние абсцизовой кислоты на экспрессию генов про- и антиапоптотического белков у растений огурца при низких температурах // Доклады РАН. 2017. Т. 477, №.2. С. 249–252. ИФ РИНЦ: 1,008, ИФ JSR: 0.257. ИФ Scopus: 0.610.
5. **Игнатенко А.А.**, Репкина Н.С., Таланова В.В. Участие каталазы и пероксидазы в повышении устойчивости пшеницы к низкой температуре // Труды Карельского научного центра РАН. 2018. № 4. С.74–83. ИФ РИНЦ: 0,375.
6. Таланова В. В., Титов А. Ф., Репкина Н. С., **Игнатенко А. А.** Влияние метилжасмоната на экспрессию генов *WCS* и активность антиоксидантных ферментов при холодовой адаптации пшеницы // Доклады РАН. 2018 (принята в печать). ИФ РИНЦ: 1,008, ИФ JSR: 0.257. ИФ Scopus: 0.610.

Публикации в других изданиях

7. Таланова В.В., Репкина Н.С., **Фенько А.А. (Игнатенко А.А.)** Влияние салициловой кислоты на устойчивости проростков огурца к низким температурам // Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты: сборник материалов IX Международного симпозиума (Москва, 20-25 апреля 2015 г.). М.: ИФР РАН, 2015. С. 440–443.
8. **Фенько А.А. (Игнатенко А.А.)**, Репкина Н.С., Таланова В.В. Влияние низких температур на содержание пролина и глутатиона у контрастных по холодоустойчивости растений // Биология – наука XXI века: Сб. тез. 19-й международной Пущинской школы-конференции молодых ученых (Пущино, 20-24 апреля 2015 г.). Пущино, 2015. С. 407–408.
9. Repkina N.S., **Fenko A.A. (Ignatenko A.A.)**, Talanova V.V. Separate and combined effect of low temperatures and cadmium on wheat growth // Abstracts of International conference «Plant growth, nutrition and environment interaction» (Vienna, June 25-26, 2015). Vienna, Austria, 2015. P. 31.

10. **Фенько А.А. (Игнатенко А.А.)**, Репкина Н.С., Нилова И.А., Таланова В.В. Влияние низких температур на содержание низкомолекулярных антиоксидантов у различающихся по холодоустойчивости растений // 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, 21-26 сентября 2015 г.). Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2015. С.554
11. Репкина Н.С., Таланова В.В., Батова Ю.В., **Фенько А.А. (Игнатенко А.А.)** Влияние стресс-факторов на содержание транскриптов генов глутатионсинтетазы и фитохелатинсинтазы у пшеницы // 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, 21-26 сентября 2015 г.). Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2015. С. 447.
12. **Фенько А.А. (Игнатенко А.А.)**, Репкина Н.С., Венжик Ю.В., Таланова В.В. Динамика содержания низкомолекулярных антиоксидантов в процессе холодовой адаптации пшеницы // Тезисы докладов III (XI) Международной ботанической конференции молодых ученых (Санкт-Петербург, 04-09 октября 2015 г.). СПб.: БИН РАН, 2015. С. 84–85.
13. Венжик Ю.В., Титов А.Ф., **Фенько А.А. (Игнатенко А.А.)**, Холопцева Е.С., Репкина Н.С., Таланова В.В. Активность фотосинтетического аппарата и холодоустойчивость пшеницы при адаптации к низким положительным температурам разной интенсивности // Фундаментальные и прикладные проблемы современной экспериментальной биологии растений: сборник материалов Всероссийской научной конференции с международным участием и школы для молодых ученых, посвященной 125-летию Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (Москва, 23-27 ноября 2015 г.). Москва: ИФР РАН, 2015. С. 140–142.
14. **Игнатенко А.А.**, Репкина Н.С. Протекторное действие экзогенной салициловой кислоты на растения огурца в условиях гипотермии // Биология – наука XXI века: Сб. тез. 20-й международной Пущинской школы-конференции молодых ученых (Пущино, 18-22 апреля 2016 г.). Пущино, 2016. С. 351–352.
15. Венжик Ю.В., Титов А.Ф., Холопцева Е.С., Репкина Н.С., **Игнатенко А.А.**, Таланова В.В. Особенности адаптации растений озимой пшеницы к низкой температуре // Биологические аспекты распространения, адаптации и устойчивости растений: Материалы Всероссийской (с международным участием) научной конференции (Саранск, 15-18 мая 2016 г.). Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2016. С. 67–69.
16. Венжик Ю.В., Титов А.Ф., Репкина Н.С., **Игнатенко А.А.**, Таланова В.В. Рост и устойчивость растений в условиях действия низкой температуры и кадмия // Роль науки в решении проблем региона и страны: фундаментальные и прикладные исследования. Материалы Всероссийской научной конференции с международным

участием, посвященной 70-летию КарНЦ РАН (Петрозаводск, 24–27 мая 2016 г.). Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН, 2016. С.111–114.

17. **Ignatenko A.A.**, Talanova V.V., Titov A.F., Repkina N.S., Venzhik Yu.V. The role of abscisic acid in wheat plants adaptation to low temperatures // *Proceedings of Fourth International Symposium on Plant Signaling and Behavior* (Saint Petersburg, 19-24 June 2016). St. Petersburg: SINEL Co. Ltd., 2016. P. 46.

18. **Игнатенко А.А.**, Таланова В.В., Титов А.Ф., Репкина Н.С., Венжик Ю.В. Роль низкомолекулярных протекторов в процессе повышения устойчивости растений пшеницы к низкотемпературным воздействиям разной интенсивности // *Годичное собрание общества физиологов растений России. Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма* (Санкт-Петербург, 21–24 июня 2016 г.). Санкт-Петербург, Изд-во Санкт-Петербургского государственного университета, 2016. С. 227–228.

19. **Игнатенко А. А.**, Панфилова К.М., Репкина Н.С. Влияние экзогенной салициловой кислоты на активность антиоксидантной системы растений пшеницы при действии низкой температуры // *Материалы XXIV Международной молодежной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «ЛОМОНОСОВ-2017»* / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. [Электронный ресурс]. (Москва, 10–14 апреля 2017 г.). Москва: МАКС Пресс, 2017. С. 1–2.

20. **Игнатенко А.А.**, Таланова В.В., Титов А.Ф., Репкина Н.С., Венжик Ю.В., Панфилова К.М. Влияние низкотемпературного закаливания на антиоксидантную систему озимой пшеницы // *Материалы II международного симпозиума «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» и международной научной школы «Роль активных форм кислорода в жизни растений»* (Уфа, 26 июня–1 июля, 2017 г.) / ред. И.В. Максимов и др. Уфа: ООО «Первая типография», 2017. С. 340–343.

21. Репкина Н.С., Таланова В.В., **Игнатенко А.А.** Влияние салициловой кислоты на активность супероксиддисмутазы и экспрессию кодирующих ее генов у растений огурца при действии низких температур // *Материалы II международного симпозиума «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» и международной научной школы «Роль активных форм кислорода в жизни растений»* (Уфа, 26 июня–1 июля, 2017 г.) / ред. И.В. Максимов и др. Уфа: ООО «Первая типография», 2017. С. 394–397.

22. **Игнатенко А.А.**, Таланова В.В., Репкина Н.С., Титов А.Ф. Некоторые особенности реакции растений огурца на действие закаливающей и повреждающей температуры // *Сборник материалов докладов Научной конференции и школы молодых ученых «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты», Годичное собрание ОФР* (Судак, 18–24 сентября, 2017 г.) / Отв. ред. Вл.В. Кузнецов – М: Изд-во АНО «Центр содействия научной, образовательной и просветительской деятельности «Соцветие», 2017. С. 181.

23. **Ignatenko A.A.**, Repkina N.S., Talanova V.V. Antioxidant system activity in plants contrasting in cold tolerance under hypothermia // Proceedings of the International conference «YOUNG BIOLOGISTS SCIENCE WEEK-2017» (Petrozavodsk, 20–25 November 2017). Petrozavodsk, 2017. P. 185–187.
24. Repkina N.S., **Ignatenko A.A.**, Batova Yu.V., Talanova V.V. The wheat response to cadmium at low and high temperatures influence // Proceedings of the International conference «YOUNG BIOLOGISTS SCIENCE WEEK-2017» (Petrozavodsk, 20–25 November 2017). Petrozavodsk, 2017. P. 453–456.
25. **Игнатенко А.А.**, Репкина Н.С., Таланова В.В. Особенности реакции растений *Cucumis sativus* L., подвергнутых обработке салициловой кислотой, на низкотемпературные воздействия разной интенсивности // Материалы IV (XII) Международной ботанической конференции молодых ученых в Санкт-Петербурге (Санкт-Петербург, 22–28 апреля 2018 г.). СПб.: БИН РАН, 2018. С. 168–169.
26. **Игнатенко А.А.**, Репкина Н.С., Таланова В.В., Титов А.Ф. Участие салициловой кислоты в регуляции активности антиоксидантной системы при холодовой адаптации пшеницы // Фенольные соединения: функциональная роль в растениях: сборник научных статей по материалам X Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 14–19 мая 2018 г.). / Отв. ред. Н. В. Загоскина – М.: ИФР РАН, 2018. С.166–169.
27. **Игнатенко А.А.**, Таланова В.В., Репкина Н.С., Холопцева Е.С., Титов А.Ф. Метилжасмонат повышает холодоустойчивость растений пшеницы при обычной и пониженной температуре // Клеточная биология и биотехнология растений: тез. докл. II Международ. науч.-практ. конф. (28–31 мая 2018 г.). Отв. Ред. И. И. Смолич. Минск: БГУ, 2018. С. 61–62.
28. **Игнатенко А.А.**, Репкина Н.С., Таланова В.В., Титов А.Ф. Динамика активности антиоксидантных ферментов в листьях *Triticum aestivum* L. при холодовом закаливании // Ботаника в современном мире. Труды XIV Съезда Русского ботанического общества и конференции «Ботаника в современном мире» (Махачкала, 18–23 июня 2018 г.). Т. 3: Споровые растения. Микология. Структурная ботаника. Физиология и биохимия растений. Эмбриология растений. – Махачкала: АЛЕФ, 2018, 2018. С. 270–272.
29. Repkina N.S., **Ignatenko A.A.**, Talanova V.V. Effect of exogenous methyl jasmonate on cold tolerance of wheat // Abstracts of SEB Florence 2018 (**Florence**, 3–6 July 2018). Florence, Italy, 2018. P. 228.
30. Repkina N.S., **Ignatenko A.A.**, Talanova V.V. Effect of cadmium and its combination with low and high temperature on activity of antioxidant enzymes in wheat // FEBS Open Bio 8 (Suppl.S1) (**Prague**, 7–12 July 2018). Prague, Czech Republic, 2018. P. 165.

Список конкурсных проектов, в рамках которого выполнялись исследования

Конкурсный проект РФФИ «Роль непротеиновых тиолов (глутатиона и фитохелатинов) в механизмах адаптации растений к действию стресс-факторов разной природы (№14-04-31676_мол_а, руководитель Репкина Н. С.).

Благодарности

Автор выражает глубокую сердечную признательность своему научному руководителю, д.б.н. В. В. Талановой за постоянную и неоценимую поддержку, за чуткое внимание и всестороннюю помощь на всех этапах выполнения научно-квалификационной работы (диссертации). Автор искренне благодарит к.б.н. Н.С. Репкину, к.б.н. Ю.В. Венжик, И.А. Нилову и К.М. Панфилову за помощь в проведении экспериментальной работы и постоянную поддержку. Автор выражает признательность к.б.н. Ю.В. Батовой и К.М. Никеровой за методическую помощь и ценные рекомендации при проведении экспериментов по анализу активности антиоксидантных ферментов. Теплые слова благодарности руководителю лаборатории экологической физиологии растений чл.-корр. РАН, проф., д.б.н. А.Ф.Титову и всем сотрудникам лаборатории за ценные советы и рекомендации при обсуждении результатов исследования. Особые слова благодарности автор выражает своему супругу Р.В. Игнатенко и всей своей семье за неоценимую помощь и постоянную моральную поддержку на протяжении всех этапов выполнения научно-квалификационной работы (диссертации).