МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

**ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

Факультет физико-математических и естественных наук

Кафедра «Общая биология и биохимия»

Направление подготовки 06.04.01 Биология

Магистерская программа Биохимия и молекулярная биология

Форма обучения очная

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

**на тему:**

# «ДЕЙСТВИЕ НИЗКИХ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ТЕМПЕРАТУР НА АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ ТЕПЛОЛЮБИВЫХ РАСТЕНИЙ»

**Студент** _____ Тужилова Юлия Андреевна

**Руководитель** _____ Левашова О. А.

**Рецензент** _____ Иванов А.И.

**Нормоконтролер** _____ Кручинина А.Д.

*Работа допущена к защите* (протокол заседания кафедры от 08.06.19 № 15)

**Заведующий кафедрой** _____ Карпова Г.А.

*Работа защищена с отметкой* отлично

(протокол заседания ГЭК от 20.06.19 № 5)

**Секретарь ГЭК** _____ Клыченков С.В.

Пенза, 2019

**СОДЕРЖАНИЕ**

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**……4

**ВВЕДЕНИЕ**.....5

**ГЛАВА 1.** ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....8

1.1 Описание культуры гречихи……8

1.2 Климат Пензенской области…….……...8

1.3 Общее представление о стрессе и факторах, вызывающих стресс у растений……..…10

1.4 Концепция Селье и ее перенос на растительную систему……...…11

1.5 Адаптация растений к низким температурам…….....….14

1.6 Система защиты растений от активных форм кислорода……...16

1.7 Образование активных форм кислорода……...19

1.8 Система антиоксидантной защиты……22

1.8.1 Способы снижения образования активных форм кислорода……..….22

1.8.2 Система антиоксидантной защиты……24

1.9 Компоненты антиоксидантной системы растений…….……..26

1.9.1 Каталаза…….…26

1.9.2 Пролин……...27

1.9.3 Пероксидаза……..28

1.9.4 Полифенолоксидаза…….…29

**ГЛАВА 2.** МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....31

1.1 Объект исследования…….….31

1.2 Определение активности каталазы……33

1.3 Определение содержания пролина……34

1.4 Определение активности полифенолоксидазы……36

1.5 Определение активности пероксидазы…….…38

1.6 Методы статистической обработки данных……..……...40

**ГЛАВА 3.** РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....41

1.1 Действие низких положительных температур на активность пероксидаз в семенах и ростках гречихи……41
1.2 Действие низких положительных температур на активность полифенолоксидазы в сменах и ростках гречихи…….….45
1.3 Содержание пролина в семенах и ростках гречихи в условиях низкотемпературного воздействия…….…….49
1.4 Содержание каталазы в семенах и ростках гречихи в условиях низкотемпературного воздействия……..…53
**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**…….…..57
**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**.....60

# СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК- активные формы кислорода

ПФО- полифенолоксидаза

НПТ- низкие положительные температуры

ПО- пероксидаза

ПОЛ- перекисное окисление липидов

СОД- супероксиддисмутаза

АТФ- аденозинтрифосфат

АДФ- аденозиндифосфат

# ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность работы** заключается не только в научном, но и в практическом интересе для сельскохозяйственной промышленности, поскольку Пензенская область находится в зоне рискованного земледелия, и изучение влияния низких температур на активность антиоксидантных ферментов растений в начальном периоде онтогенеза поможет повысить устойчивость теплолюбивых культур перед заморозками.

В процессе своей жизнедеятельности растения попадают под влияние негативных факторов окружающей среды, которые делят на биотические и абиотические. Ко многим из них растительные организмы не приспособились с течением эволюции, поэтому эти факторы могут приводить к повреждению структур и метаболическим функций клеток растений, а также физико-химическим аномалиям. Температурные воздействия, в том числе пониженные положительные, являются для культурных растений наиболее значимыми. Неблагоприятные факторы определяют возникновение в растениях совокупность различных реакций, которые называют общим термином «стресс». Стрессом называют индуцируемые из-за влияния факторов внешней среды отрицательные сдвиги в метаболизме. Эти изменения в состоянии жизнедеятельности растений носят обратимый характер. Выживание растениям обеспечено за счет протекания двух кардинально разных реакций: стресс-реакции (быстрого стрессорного ответа) и специализированной (долговременной) адаптации.

Отрицательное воздействие стрессоров разнообразной природы, приводит к усиленной генерации активных форм кислорода (АФК). Как только АФК начинает взаимодействовать с липидами, белками и нуклеиновыми кислотами структура и функция мембран нарушается, потому возникают мутагенезы, снижается активность ферментов, это влечет за собой остановку клеточного цикла и апоптоз. В тоже время, ускорение генерации АФК активирует антиоксидантную защитную систему, компоненты

альтернативного защитного механизма которой выступает стресс-зависимое накопление низкомолекулярных органических антиоксидантов, таких как α-токоферол, глутатион, аскорбиновая кислота, пролин, каротиноиды, полиамины (ПА), антоцианы и прочие соединения.

В последнее время в биохимии, а также в молекулярной биологии, большое внимание уделяется проблеме стресса и изучению компенсаторных и регуляторных механизмов функционирования антиоксидантной системы растений в стрессовых и нормальных условиях. Наравне с движением, размножением, питанием и прочим, одним из обязательных свойств живого организма является способность к защите от действия абиотических и биотических факторов среды. Возникла эта функция одновременно с появлением первых живых существ, и с течением эволюционных процессов активно развивалась и совершенствовалась. Для биохимии важно изучение влияния неблагоприятных факторов внешней среды и ответных реакций не только животного, но и растительного организма.

*Целью данной работы* является изучение воздействия низких положительных температур на активность антиоксидантных ферментов теплолюбивых растений.

Для реализации поставленной цели необходимо решение ряда задач:

1. Провести анализ литературных источников, связанных с темой антиоксидантной системы растений и составляющих ее ферментов.

2. Отследить изменения активности каталазы в семенах и проростках гречихи в условиях низких положительных температур.

3. Отследить изменения активности пролина в семенах и проростках гречихи в условиях низких положительных температур.

4. Отследить изменения активности пероксидазы в семенах и проростках гречихи в условиях низких положительных температур.

5. Отследить изменения активности полифенолоксидазы в семенах и проростках гречихи в условиях низких положительных температур.

Магистерская диссертация изложена на 67 страницах, иллюстрирована 28 рисунками. Список литературы содержит 64 наименования на русском и иностранных языках.

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Описание культуры гречихи

Гречиха относится к семейству гречишных (Polygonaceae) и роду (Fagopyrum Gaertn.). Существует несколько видов гречихи, основной — гречиха культурная (Fagopyrum esculentum Moench. или Polygonum fagopyrum L.) делится на два подвида: гречиха обыкновенная (ssp. vulgare Stol.) и гречиха многолистная (ssp. multijolium Stol.).

Гречиха относится к ценным крупяным культурам, которые требовательны к месту произрастанию и плодородию почвы. Средние суглинки и окультуренные легкие, обеспечивают более высокий урожай, чего нельзя сказать о песчаных и глинистых почвах, которые малопригодны для выращивания данной культуры. Это растение теплолюбиво, прогрев почвы до 8-10° С стимулирует прорастание семян. При температуре почвы 14-16° С появляются дружные всходы. Высевание происходит позже яровых зерновых культур. Наиболее высокие урожаи гречихи наблюдают на гумусированных почвах при умеренном увлажнении. От других зерновых культур, гречиху отличает длительным периодом вегетации, цветением и неравномерным созреванием. Заморозки приводят к отмиранию верхушки растений, не смотря на это, происходит не снижение урожайности, а образование дополнительных побегов [40].

## 1.2 Климат Пензенской области

Территориально Пензенская область находится в умеренном климатическом поясе и обладает умеренно-континентальным типом климата.

В теплый период года температура воздуха повышается с севера на юг, а в холодный период опускается с запада на восток, чему способствует главенствующий западный перенос воздушных масс. Наибольшее

количество осадков выпадает в северо-западной стороне области, наименьшее количество приходится на юго-восток, где климат более засушлив.

С наступлением марта зима не отступает, температура месяца варьируется от -7 до 8°С, однако, в конце месяца снежные покровы начинают обильно таять (таблица 1). Апрель является переходным периодом от снеготаяния до прогрева воздуха до +5°С. Заморозки прекращаются со второй половины мая и в первых числах июня могут снова возобновиться, когда температура воздуха поднимается выше +15°С.

*Таблица 1. Усредненное значение климата Пензенской области*

| Показатель | Янв. | Фев. | Март | Апр. | Май | Июнь | Июль | Авг. | Сен. | Окт. | Нояб. | Дек. | Год |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Абсолютный максимум, °C | 6,0 | 6,0 | 17,0 | 31,1 | 35,4 | 37,4 | 45,0 | 41,0 | 34,8 | 25,0 | 15,0 | 8,0 | 45,0 |
| Средний максимум, °C | −5,7 | −5,4 | 0,4 | 12,1 | 20,7 | 24,5 | 26,4 | 24,6 | 18,1 | 9,7 | 0,6 | −4,6 | 10,1 |
| Средняя температура, °C | −8,9 | −9,3 | −3,8 | 6,5 | 13,9 | 18,0 | 19,9 | 17,9 | 12,1 | 5,4 | −2,3 | −7,6 | 5,2 |
| Средний минимум, °C | −12,1 | −12,8 | −7,5 | 1,5 | 7,5 | 12,0 | 13,8 | 12,0 | 7,2 | 1,9 | −4,7 | −10,5 | 0,7 |
| Абсолютный минимум, °C | −39 | −40 | −31,1 | −20 | −5,8 | −2,2 | 2,0 | 0,0 | −6,1 | −17,2 | −31,1 | −40 | −40 |
| Норма осадков, мм | 34 | 28 | 32 | 33 | 41 | 63 | 59 | 50 | 52 | 46 | 45 | 38 | 521 |

Исходя из описанных выше фактов, становится понятно, что Пензенская область относится к зоне рискованного земледелия, поскольку в мае, когда происходит засев полей, еще велика вероятность заморозков, которые могут негативно сказаться на будущем урожае. Поэтому важно выяснить влияние низких положительных температур, типичных для края, на жизнедеятельность посевных культур, которые играют большую роль в ее экономическом и сельскохозяйственном развитии.

## 1.3 Общее представление о стрессе и факторах, вызывающих стресс у растений

В середине XIX – начале XX вв. формировалось представление об интегрированном функционировании организма, о его взаимодействии со внешней средой, как единое целое. Немецкий врач и патологоанатом Р. Вирхов внес существенный вклад в развитие физиологии и медицины в данном направлении.

Французский физиолог К. Бернар положил начало разработке концепции стресса. Он путем постановки экспериментов показал принципы поддержания гомеостаза в организме.

Само понятие «стресс» в науку ввел Ганс Селье, называющий это явление синдромом общей адаптации. Под стрессом подразумевают сходный у всех особей ответ организма на разнообразные раздражители. Одна из главных ролей стресса - это мобилизация в критической ситуации всех защитных механизмов организма.

Факторов, способных вызвать стрессовое состояние у растительного организма множество: бактериальные инфекции, интоксикация различного характера, механические повреждения, высокая и низкая температура и прочее [31].

В настоящее время у растений была обнаружена способность с помощью дистанционных электрических сигналов распространять стресс далеко за пределы локальной области влияния стрессирующего фактора. Реализовалось это умение благодаря потенциалу действия (ПД) и вариабельному потенциалу (ВП), который возникает только при условии жесткого стресса, такого как повреждение растения. При распространении по организму, вариабельный потенциал и потенциал действия способствуют временному повышению сопротивляемости органов и тканей к действию раздражителя.

Дистанционный электрический сигнал, выполняющий роль псевдострессора за счет имитации воздействия настоящего стрессора, приводит к изменению проницаемости мембран и возникновению неспецифических эффектов и интенсивному процессу дыхания.

Механизм восприятия растительными клетками стрессоров разнообразной природы до сих пор остается практически не изученным. Однако можно предположить, что в этом восприятии не последнюю роль играют мембраны клеток, которые способны менять свою текучесть в ответ на изменения во внешней среде [50].

## 1.4 Теория стресса Ганса Селье и ее перенос на растительную систему.

Теория стресса была сформулирована в 1936 году канадским физиологом Гансом Селье, номинированным в 1949 году на Нобелевскую премию.

Для середины XX века исследования Селье и полученные благодаря им результаты были новаторскими. Считалось, влияние окружающей среды на живой организм носит специфический характер. Селье напротив, считал, что биологические реакции подчиняются общим закономерностям. В своих экспериментах он установил, что в основе ответных реакций организмов на внешние факторы лежит неспецифический компонент биохимических изменений организма. Это заключение послужило предпосылкой к появлению термина «стресс» или «адаптационный синдром», и, в дальнейшем, к формулированию теории стресса Селье, как неспецифической реакции организма на деструктивные факторы внешней среды [52].

Селье считал, что характерной чертой жизни является способность к приспособлению и это результат напряжения, специальной концентрации усилий.

По теории, синдром стресса проходит в три стадии:

1. *Стадия реакции тревоги* (с делением на фазы шока и контрашока) – это первичная реакция, выражающая призыв организма к активации защитных механизмов. Во время этой фазы происходят отклонения в биохимических и физиологических процессах, проявляются нанесенные повреждения и запускаются защитные реакции. Если отрицательные воздействия слишком разрушительны, то организм рискует погибнуть в течении первых часов стадии тревоги. В случае, когда этого не произошло, то наступает вторая стадия синдрома стресса.
2. *Стадия адаптации, или резистентности.* Отличительной чертой этой стадии является преобладание процессов синтеза над процессами распада соединений в тканях. Организм либо адаптируется к новым условиям, либо влияние стресса усиливается. Важным критерием для успешной адаптации к негативному воздействию является его низкая скорость развития. После окончания стадии адаптации, при пониженном уровне процессов, организм способен нормально функционировать при неблагоприятных условиях.
3. *Стадия истощения, или гибели* развивается при длительном действии стресса на организм.

Понятие «стресс» употребимо не только в отношении животных, но и растений. В таком случае, стресс рассматривается как комплексная защитная реакция со специфическими и неспецифическими компонентами, которые являются общими для разных типов стрессоров.

К примеру, к неспецифической составляющей стресса относятся:

- повышение деполяризации и проницаемости клеточных мембран,
- синтез «стрессорных» белков,
- повышение содержания ионов кальция в цитоплазме,
- повышение интенсивности дыхания,

- выход из клеток ионов калия,
- увеличение вязкости цитоплазмы,
- замедление роста и деления клеток,
- замедление фотосинтеза,
- увеличение продукции абсцизовой и жасмоновой кислот, этилена.

Такой обширный список признаков подтолкнул исследователей к созданию теории, что стресс - это интегральный неспецифический ответ, цель которого заключается в мобилизации защитных механизмов растения. Кроме того, растения обладают способностью распространять состояние стресса далеко за пределы влияния стрессирующего фактора при помощи дистанционных электрических сигналов [1].

Основной функцией адаптационного синдрома, как обозначил стресс в своих трудах Ганс Селье, является мобилизация защитных механизмов организма в критической ситуации. Это подтверждает в своих статьях известный русский физиолог С.С. Пятыгин, утверждая, что из-за статичного положения, большинство растений не могут избежать стрессорных факторов и вынуждены полагаться только на свои силы и возможности в борьбе с ними. Помимо прочего, Пятыгин напоминает, что не стоит игнорировать специфическую составляющую стресса. К примеру, хитозан, компонент грибных клеток, или эргостерол, химический стрессор, при многократном воздействии на растительный организм, вызывают снижение чувствительности к ним, что относится к специфическим реакциям [34].

Опытным путем исследователи установили, что у растений стресс развивается в несколько этапов [39]:

1. При снижении температуры до определенного уровня, развивается первичная стрессовая деполяризация;
2. Если показатели температуры остаются низкими продолжительное время, то наступает адаптивная реполяризация;
3. При сильном переохлаждении возникает вторичная деполяризация.

Описанные выше этапы схожи с классическими фазами стресса по Г. Селье и соответствуют тревоге, адаптационному периоду и истощению ресурсов.

Во многих других ситуациях, растения действуют по этому же трехстадийному алгоритму.

## 1.5 Устойчивость растений к низким температурам

Способность растений устойчиво переносить низкие температуры можно разделить на три вида: холодостойкость, морозоустойчивость и зимостойкость.

Холодостойкостью называют умение растительного организма переносить низкие положительные температуры. Особенно уязвимыми перед действием низких положительных температур оказываются теплолюбивые растения. Первыми симптомами переохлаждения служит появление некротических пятен на тканях растения и увядание листьев. К этим последствиям приводят: разобщение процессов дыхания и окислительного фосфорилирования, увеличение проницаемости мембран, накопление токсических веществ, дисбаланс в темновой фазе фотосинтеза и фотосинтетическом фосфорилировании, сбой в процессах синтеза белка [49]. Среди этих причин, наиболее значимой является переход липидов мембран в гель из жидкокристаллического состояния. Это приводит к изменению активности переносчиков многих ферментов и белков в ионных каналах- $H^+$-АТФаз, и в итоге у клеточных мембран пропадает эластичность. Из-за увеличившейся проницаемости мембраны, через тонопласт и плазмалемму во внешнюю среду устремляются все водорастворимые соединения, в хлоропласты из вакуолей проникают органические кислоты и превращают в феофитин весь хлорофилл [5].

На примере теплолюбивых представителей овощных культур было доказано, что понижение температуры до +4 тормозит клеточное дыхание

растения. При этом, в первые часы после понижения температуры было замечено увеличение в клетках количества АТФ, что связано с замедлением энергозатратных процессов роста. При пролонгированном действии пониженных температур, количество АТФ резко падает, это приводит нарушению функций корневой системы, что влияет на всасывания солей и воды из почвы. По той же причине уменьшается транспорт нитратов в листья из корней, еще больше ухудшает сложившееся положение уменьшение скорости оттока в корнях. Кроме того, из-за нарушения согласованной работы ферментов, резко увеличивается количество таких эндогенных токсинов, как этанол и ацетальдегид [22].

Длительное воздействие низких положительных температур на растительный организм приводит в потребление растяжения к снижению скорости роста клеток, а в митотическом цикле увеличивает длительность всех фаз. Вследствие этого, клетки переходят к дифференцировке, не дождавшись начала синтеза лигнина, отвечающего за прочность клеточной стенки [4].

В последние годы, исследователи активно прорабатывать две теории возникновения индукции холодового повреждения:

1. К индукции приводит увеличение концентрации цитозольного ионизированного Ca2+ ([Ca2+]цит).

2. Индукция у теплолюбивых растений является результатом окислительного стресса при значительном охлаждении.

Большое количество исследований свидетельствует о том, что при охлаждении теплолюбивых растений образуются активные формы кислорода (АФК). Индукция холодового повреждения, выработанную во время процесса охлаждения, измеряется по увеличению показателей интенсивности протекания реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ) [2].

При непродолжительном воздействии низкими температурами, в хлоропластах, митохондриях, а также на плазмалемме блокируется система транспорта электронов. Это приводит к тому, что к молекулярному

кислороду переходит энергия электронов, образуя активные формы кислорода [29].

## 1.6 Адаптация растений к низким температурам

Рассмотрим ряд приспособлений теплолюбивых растений для защиты от низких положительных температур.

Во-первых, чтобы предотвратить утечку ионов и поддерживать в стабильном состоянии клеточные мембраны, растению необходимо иметь большое количество ненасыщенных кислот в составе мембранных фосфолипидов. Образование в насыщенных жирных кислотах двойных связей за счет таких ферментов как десатураза и ацетилтрансфераза, обеспечит мембранам защиту от разрушения и сохранит их подвижность [38].

Во-вторых, главной особенностью приспособительных свойств растительного организма является умение поддерживать метаболизм даже при продолжительном снижении температуры. Это было бы невозможно без синтеза протекторных соединений и ферментов, способных работать даже в низких температурных диапазонах. Устойчивое к похолоданию растение увеличивает синтез стрессовых белков, усиливает эффективность работы антиоксидантной системы и на первый план у него выходит дыхание по пентозофосфатному пути [57].

Чтобы увеличить устойчивость семян к похолоданию, перед посевом их необходимо замачивать. Для этого берут семена с проклюнувшимся ростком и на несколько суток помещают в условия с чередующейся температурой от 1-5°С до 15-22°С каждые 12 часов. Для большей эффективности можно использовать водные растворы, обогащенные микроэлементами, такими как Zn, Mn, Cu, B, Mo. Ряд исследований указывает на благоприятное влияние при повышении холодстойкости семян, влияют цитокинины, абсцизовая кислота и хлорхолинхлорид [3].

После процессов фотосинтеза в качестве постоянного побочного продукта в клетках остается молекулярный кислород. Помимо прочего, он вырабатывается в ответ на воздействия биотической, антропогенной, абиотичекой природы, что для растительного организма является стрессом. Поэтому он оказывает токсическое действие на организмы, использующие кислород или продукты его восстановления. Для контроля уровня молекулярного кислорода в клетке и поддержания прооксидантно-антиоксидантного равновесия существует антиоксидантная система.

Активированные формы кислорода (АФК), представляющие серьезную угрозу для растения, представляют собой группу короткоживущих форм кислорода, возникших в результате его окислительно-восстановительных превращений или электронного возбуждения, и способных к взаимопревращениям [7].

Большинство исследователей двадцатого века считали нарушение обмена веществ главной причиной холодового повреждения теплолюбивых растений. А сдвиги необратимого характера в процессах обмена веществ и изменения в структуре протоплазмы вменяли в вину неэффективному потреблению энергии, образованной в процессе дыхания. Однако, на данный момент известно, низкие температуры приводят к нарушению баланса между реакциями распада и синтеза, и из-за преобладания реакций распада происходит гибель теплолюбивых растений. Только в результате чрезмерного по времени охлаждения, появляются изменения в метаболизме, которые как и изменение водного режима, не могут быть основной причиной холодового повреждения. Только после вторичной дисфункции, связанной с отогревом, происходит накопление токсичных продуктов жизнедеятельности организма, что опровергает теорию о холодовом повреждении растений в результате дисбаланса метаболизма [8].

В 70е года XX в. на фоне множества гипотез о явлениях, побуждающих к возникновению реакций на низкие температуры, выделяется гипотеза о фазовых изменениях мембран. По ней, причина холодового повреждения

мембран кроется в изменении молекулярной упорядоченности липидов мембран. Повреждения клетке, а также нарушения клеточной мембраны вызывают твердофазные домены, образованные фазовыми переходами малых фракций липидов, среди которых молекулярные формы фосфатидилглицерола с высокой температурой плавления. Благодаря разделению компонентов мембран на фазы с помощью полностью или частично свободных от белковых молекул участками гелевидных липидов, в бислое, была реализована возможность фазового перехода молекул между слоями. Эти микродомены образуются на время и без возможности на обратную реакцию. Малейшие изменения в липидном слое мембран растений приводит к дисбалансу метаболизма, увеличению показателей проницаемости мембран и понижению количества молекул АТФ [26].

К вторичным нарушениям, связанным с холодовым повреждением, относят усиление неизбирательной проницаемости мембраны растительной клетки. Эти перемены не возникают непосредственно после начала охлаждения, и не сопровождаются резким падением уровня АТФ. Если опираться на гипотезу фазовых переходов, то повреждение мембран за счет увеличения проницаемости под воздействием низких температур, должно быть зафиксировано в первые минуты после начала охлаждения тканей растения. В действительности же все происходит наоборот, и чем дольше низкие температуры воздействуют на организм, тем выше пассивная проницаемость клеточных мембран [53]. Более того, интенсивный выход электролитов через мембрану является следствием усугубленного охлаждением водного стресса, который слабее проявляется в насыщенной водными парами атмосфере даже под действием низких температур, при этом, усилить реакции водного стресса способно интенсивное освещение. Поэтому, вероятнее всего, что фазовый дрейф липидов в мембранах клеток и органелл, таких как хлоропласты и митохондрии, не является первостепенной причиной возникновения холодового повреждения, хоть и играют в нем определенную роль [15].

В 80е года XX в. было установлено, что повреждения тканей растений в результате переохлаждения при увеличении яркости освещения только усугублялись. Какой же результат имело размещение на свету подвергнутое охлаждению растение. Из выше сказанного, можно сделать вывод, что освещение занимает не последнее место в реакциях холодового повреждения теплолюбивых растений. Это объясняется тем, что при пониженных температурах и избыточном освещении энергия возбуждения выделяется в избытке, что провоцирует фотоокислительное повреждение фотосистем в мембранах тилакоидов, а также усиливает фотоингибирование реакций фотосинтеза [24].

На сегодняшний момент были разработаны гипотезы о связи повышения концентрации ионизированного цитозольного кальция с возникновением окислительного стресса и холодового повреждения у теплолюбивых растительных организмов. Окислительный стресс при пониженных температурах вызван интенсивным образованием супероксидного анион-радикала. Повышенный уровень кислорода в тканях обеспечивает увеличение количества АФК, что ингибирует реакции перекисного окисления липидов и запускает процесс синтеза изоферментов супероксиддисмутазы (СОД). Одновременно с этим, разворачивается деятельность клетки, призванная не только снять окислительный стресс, но и повысить количество производимых молекул СОД, активность антиоксидантных ферментов и низкомолекулярных антиоксидантов. В дальнейшем, при условии продолжительного действия низких температур это приведет к снижению уровня АФК, активного кислорода в тканях и сведет на нет окислительный стресс. Однако не все так просто, ведь на втором этапе холодового стресса интенсивность перекисного окисления липидов возрастает, что обуславливает структурные изменения мембраны (повышается проницаемость для воды и различных ионов) и приводит к серьезным нарушениям большинства физиологических процессов растительной клетки [13]. Такая интенсивная стрессовая нагрузка сводится к

образованию обширных повреждений и гибели растения. То есть, антиоксидантная система, призванная защитить теплолюбивые растения от возникшего в результате переохлаждения окислительного стресса, выполняет свои функции с запозданием, когда каскадные механизмы перекисного окисления липидов уже запущены и началось разрушение липидных слоев мембраны.

На основании этого можно сделать вывод, что разница между теплолюбивыми и холодостойкими растениями заключается в том, что у вторых при охлаждении образование активных форм кислорода происходит постепенно. Это и позволяет растению избежать возникновения окислительного стресса. Но длительного воздействия низких температур не выдержит даже такой способ защиты поэтому, как только ресурсы антиоксидантной системы будут исчерпаны, и растение будет атаковано свободными радикалами, что приведет к запуску процессов холодового повреждения [16].

## 1.7. Образование активных форм кислорода

Основными источниками образования АФК при нормальной жизнедеятельности организма являются процессы фотодыхания и фотосинтеза. Даже при отсутствии стрессорных воздействий, в процессе окисления в митохондриях, цитоплазме, и прочих органеллах белков и низкомолекулярных субстратов, в растительной клетке нарушается окислительно-восстановительный баланс [12]. Образование АФК может протекать по энзиматическому пути, который связан с работой ферментов – липоксигеназы, пероксидазы, НАДФН-оксидазы и ксантиноксидазы.

По своей сути АФК в первую очередь, это радикалы состоящие из атомов или группы атомов, содержание в себе неспаренные электроны, которые способны повреждать клеточные структуры. Поскольку радикалы - это высокореактивные соединения, то в отсутствии ферментов они могут

активировать сигнальные каскады и принимать участие в ряде клеточных процессов [21]. Так как к АФК относятся радикалы, полученные при присоединении или отщеплении электронов к кислородной молекуле, то при отделении от кислорода одного из неспаренных электронов, образуется супероксид катион радикала $O_2$, а присоединение электрона – к супероксид анион радикалу $O_2^-$ . Дополнительный электрон в итоге дает пероксид ион $O_2$, который в цитозоле протонируется ионами водорода и образует высокореакционное соединение – пероксид водорода – $H_2O_2$. Разлагается $H_2O_2$ в присутствии ионов двухвалентного железа и одновалентной меди, при этом образуя очень активный гидроксид радикал OH (рис. 1,2) [56].

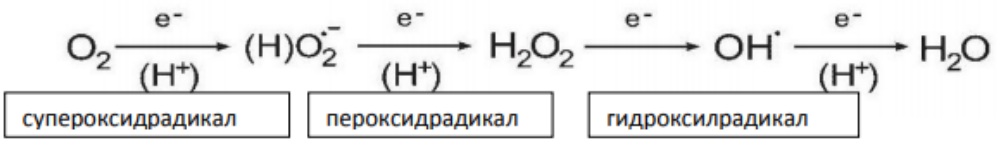



*Рисунок 1. Схема образования активных форм кислорода*

$$Fe^{+2}\,(Cu^{+1}) + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3}\,(Cu^{+2}) + OH\cdot + OH^-$$

*Рисунок 3. Реакция Фентона-Вейсса*

Поэтому супероксид-радикалы следует рассматривать как предшественников реакционноспособных соединений и прочих радикалов. Схематичное образование АФК выглядит следующим образом: супероксидрадикал (одноэлектронное восстановление), пероксид водорода (двухэлектронное восстановление), гидроксилрадикал (трехэлектронное восстановление) [58].

Уровень АФК, при котором для растительного организма не возникнет негативных последствий, необходим для лигнификации клеточных стенок, передачи стрессорного сигнала, формирования иммунного ответа, для процессов старения, а также для программируемой гибели клеток [17].

Например, вместе с абсцизовой кислотой, которая является фитогормоном, посредством активации входных кальциевых каналов $H_2O_2$ участвует в гиперполяризации мембран и регуляции открывании/закрывании устьиц [60].

## 1.8 Система защиты растений от активных форм кислорода

Активные формы кислорода - это крайне токсичные соединения, поэтому растительному организму необходимо осуществлять постоянный контроль за его количеством в клетках. Избыток АФК для растения крупная проблема, которая решается двумя способами:

1. Снижение эффективности процессов образования активных форм кислорода.
2. Запуск антиоксидантной системы [59].

### 1.8.1 Способы снижения образования активных форм кислорода

Существует множество способов снижения образования АФК, рассмотрим наиболее значимые из них.

- *Запуск в электрон-транспортной цепи митохондрий реакции активации цианид-резистентной оксидазы.* Энергия электрохимического потенциала в результате данной реакции преобразуется в тепло (а не в молекулы АТФ), которое незамедлительно рассеивается. Обычно воздействие стрессорных факторов стимулирует активацию альтернативной оксидазы [47].
- *Утечка ионов водорода.* В растительных клетках при дефиците АДФ становится заметно количество пероксида водорода, образованное митохондриями, т.е. когда не возможно возникновение электрохимического потенциала, и его преобразования в АТФ. Чтобы остановить накопление пероксида,

необходимо ввести в клетку молекулы АДФ, чтобы понизить электрический потенциал. Достигнуть данного результата возможно не связанной с синтезом АТФ незначительной утечки водород иона [48]. Есть вероятность, что митохондрии в состоянии покоя обладают механизмом увеличения утечки протонов, что вполне может предотвратить торможение процессов дыхания и восстановление ферментов и коферментов, участвующих в этом. В итоге, на внутриклеточном уровне закладывается следующий алгоритм: когда АДФ растрачивается, включается механизм утечки протонов, и выключается, стоит только молекулам АДФ снова накопиться в клетке [33].

- *Открытие пор в митохондриальной мембране.* Когда не достаточно работы системы утечки протонов, в дело вступают более радикальные способы достижения заданной цели. В определенных условиях, на внутренней стороне мембран митохондрий образуются поры, которые способны пропускать вещества, чья масса не превышает 1,5 Д. Через раскрытую пору проходит ток веществ, который способен сбалансировать градиент концентрации ионов водорода, дыхательных субстратов и т.д. Аккумулирование АФК в клетке, а точнее увеличение концентрации пероксида водорода, $O_2$ или гидроксогруппы, заставляют поры открыться, это ускоряет процесс ликвидации $O_2$, утечку протонов через мембрану и стимулирует дыхательную деятельность. Чтобы поры открылись обратно, требуется снизить электрохимический потенциал в клетке. Можно сделать вывод, что утечка протонов водорода предшествует открыванию пор [26].
- *Активация фотодыхания.* Особо актуален данный способ понижения темпа образования активных форм кислорода для

зеленой массы растения, которая реализовывает процессы фотосинтеза и подвержена воздействию высоких концентраций кислорода и светового излучения. К примеру, фотодыхание хлореллы сопряжено с синтезом НАДФН-зависимым осмопротекторапролином, который способствует устранению окислительного стресса и активируется благодаря повышению концентрации хлорида натрия [27].

### 1.8.2 Система антиоксидантной защиты

Антиоксидантная система (АОС)- это специализированная антиокислительная система с множеством компонентов, отвечающая за поддержание на достаточно низком уровне концентрацию уже образовавшихся молекул активных форм кислорода и локализацию их действия в определенном месте. Устойчивость растительного организма к различным формам стресса во многом зависит от состояния антиоксидантной системы [43].

Не смотря на постоянно растущее количество соединений, относящихся к антиоксидантам, универсальной классификации для них не разработано. Для удобства, антиоксидантные соединения принято разделять на группы в зависимости от молекулярной массы вещества. В первой группе низкомолекулярные соединения, во второй - высокомолекулярные, к которым относятся белки, ферменты и пептиды [30].

К наиболее значимым высокомолекулярным антиоксидантам растений, которые нейтрализуют негативное действие АФК, относятся белки, связывающие ионы металлов переменной валентности, а также специализированные ферментные системы (каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза и прочее), устраняющие или тормозящие свободнорадикальное окисление органических соединений. Ферментативные антиоксиданты, расположенные в различных компартментах клетки,

комплексно защищают биополимеры от АФК, обладают разной субстратной специфичностью и сродством с АФК [11].

Ферменты антиоксидантной системы незаменимые компоненты регуляции метаболизма во время онтогенеза, а также имеют особое значение для обеспечения быстрой адаптации растения к непостоянным условиям внешнего мира. Для растений, как организмов, у которых нет стабильной внутренней среды, очень важно для поддержания жизнедеятельности иметь возможность расширить свои адаптационные возможности. Осуществляется это благодаря ферментам, способным выполнять одинаковые каталитические функции [25].

Окислительный стресс отрицательно сказывается на эффективности ферментов антиоксидантной системы. Объясняется это стремительной дезактивацией свободными радикалами конститутивного пула ферментов, а также увеличением времени, которое необходимо для индукции синтеза ферментов. Помочь растению справиться со стрессом в данной ситуации могут только низкомолекулярные неферментативные антиоксиданты [23].

К низкомолекулярным антиоксидантам относятся различные по химическим свойствам и структуре соединения, вступающие в реакцию с органическими и кислородными радикалами, подавлять свободнорадикальные процессы в клетках растения. Они действуют, беря на себя удар реактивных производных кислорода, и вступив в реакцию окисления, заканчивают губительную для клетки цепь реакций. Однако, у неферментативных низкомолекулярных антиоксидантов есть существенный минус - они не так эффективны, как ферменты [14].

## 1.9 Компоненты антиоксидантной системы растений

Если при физиологических условиях константа реакции с активными формами кислорода остается низкой, то возможны процессы детоксикации АФК с помощью ферментативных реакций. Так как к числу наиболее

«стабильным» восстановленным формам кислорода в основном относятся такие соединения как пероксиды, эпоксиды и супероксиды, то закономерно будет упомянуть их, когда речь заходит о детоксикации, катализируемой ферментами [10].

У цианобактерий, водорослей и высших растений выведение АФК из клеток осуществляется кооперативно или индивидуально рядом ферментов: супероксиддисмутаза, пероксидаза, каталаза, глутатионпероксидаза, аскорбатпероксидаза, моно- и дегидроаскорбатредуктаза, гваяколпероксидаза, глутатионредуктаза и др. Стрессами или индивидуальными физиологическими параметрами могут быть индуцированы разнообразные ферменты [44].

Антиоксиданты ферментативной природы обладают против определенного вида АФК не только высокой специфичностью действий, но и специфичным органоидным и клеточным месторасположением, а также использованием в качестве катализаторов медь, цинк, марганец и железо [9].

### 1.9.1 Каталаза

Каталаза (КФ 1.11.1.6)- это тетрамерный гемсодержащий фермент, разлагающий перекись водорода до воды и молекулярного кислорода. Главным условием, благодаря которому для протекания этой реакции не нужны прочие соединения, обладающие свойством восстановителя, является высокое содержание пероксида водорода в растительной клетке [46].

Как показали филогенетические исследования, каталазы растений можно подразделить на три основных класса. Ферменты из I класса распространены как у двудольных, так и однодольных растений. Они участвуют в реакции детоксикации пероксида водорода, который в условиях нормальной жизнедеятельности накопился в глиоксисомах и пероксисомах. Каталазы из класса II чаще всего свойственны двудольным растениям, а из III класса встречаются преимущественно у однодольных [32].

Согласно последним исследованиям, каталаза активно участвует в реакции разложения перекиси водорода на воду и молекулярный кислород. Суть этого процесса заключается в том, что под воздействием перекиси водорода валентность железа, являющегося активной группой каталазы, изменяется в результате обратимых процессов. Скорость реакции по нейтрализации пероксида водорода довольно высокая, и в работу фермент включается только при наличии высоких концентрациях пероксида водорода [64]. Если обнаруживается дополнительный донор водорода, к примеру этанол, муравьиная или аскорбиноввая кислота, то восстановление пероксида водорода будет происходить даже при его низких концентрациях. Поэтому крайне важно участие других ферментов, способных разложить пероксид водорода [61].

### 1.9.2 Пролин

Пролин – это иминокислота, которая входит в число самых популярных метаболитов высших растений. Экстремальные условия, такие как засуха, действия патогенов и тяжелых металлов, низкие положительные температуры, приводят к увеличению содержания свободного пролина в десятки, а то и сотни раз.

В растительном организме, подверженном стрессорному воздействию, пролин выступает в качестве энергетического субстрата и задействован в процессах антиоксидантной защиты и осморегуляции, регулирует значение pH и соотношение НАД/НАДН [36].

Снижение у почвенного раствора водного потенциала за счет возрастающего осмотического давления клеточного сока, обеспечивает устойчивость растения к водному стрессу. В этом заключается осморегуляторная роль пролина, которой некогда приписывали стресс - протекторное действие на растительный организм. Аргументом в пользу этой теории выступала способность растения при действии стресса накапливать

пролин в тканях, который впоследствии запускал механизмы снижения водного потенциала [54]. К тому же, стресс - протекторный эффект пролина обуславливался его косвенным взаимодействием с макромолекулами, что в состоянии стресса содействовало сохранению их нативной структуры за счет стабилизации интактной гидратационной сферы белков. Образованию таких коллоидов способствовало наличие в молекуле пролина гидрофобных и гидрофильных групп. Данным механизмом действия объясняются и антиоксидантные свойства пролина [18].

### 1.9.3 Пероксидаза

Пероксидазы КФ 1.11.1.7 (ПО)- это гемсодержащие ферменты, которые можно разделить на три класса: первый класс- внутриклеточные пероксидазы относятся, второй класс характерен для грибов, а третий- это секреторные пероксидазы.

Донорами электронов для запуска процессов восстановления $H_2O_2$ пероксидазам третьего класса служат разнообразные молекулы: аскорбиновая кислота, адреналин, фенолы (пирокатехин, гваякол, гидрохинон), ароматические кислоты, глутатион. У растений весь избыток $H_2O_2$ транспортируется в вакуоли, которые имеют повышенный уровень аскорбата, глутатиона и пероксидаз, расположенных на внутренней поверхности тонопласта [19].

Секреторные пероксидазы в растительной клетке присутствуют почти в каждом компартменте - в строме и мембранах тилакоидов хлоропластов, в мембранах митохондрий, пероксисом, глиоксисом, в цитозоле и клеточной стенке. Парологи и ортологи, входящие в состав третьего класса пероксидаз имеют разные изоэлектрические точки - анионные и катионные, а также обладают очень консервативной нуклеотидной и аминокислотной последовательностью [55, 63]. При всем этом, взаимосвязь между

изменением энзиматической функцией и изоэлектрической точкой была не выявлена. Более того гены, которые кодируют секреторные пероксидазы, образуют обширное мультигенное семейство [28]. Существует мнение, что в результате эволюционных изменений, произошло увеличение количества копий этих генов. Объясняется мультигенность, помимо прочего, участием пероксидаз в защите от патогенов, которых благодаря биоразнообразию биотопов множество, а также в огромном количестве клеточных процессов [6, 62].

### 1.9.4 Полифенолоксидаза

Полифенолоксидаза КФ 1.10.3.1 (ПФО) — это обладающий различной молекулярной массой белок, содержащий медь. ПФО, взяв молекулярный кислород в качестве акцептора водорода, участвует в окислении моно-, три-, полифенолов и о-дифенолов до соответствующих хинонов. Полифенолоксидаза связана с системой переноса водорода к кислороду от субстрата. Как и пероксидаза, является индикатором интенсивности завершающей фазы дыхания растения. По имеющимся на данный момент данным, в оксидазную фазу дыхания входит процесс соединения молекулярного кислорода с водородом. Изменить течение этой фазы могут разнообразные факторы, среди которых различные элементы минерального питания растения. Включение оксидазной фазы дыхания приводит к необратимому и стремительному окислению хромогенов-полифенолов, а также к дисфункции жизнедеятельности тканей. Клеточный сок растений богат не только способными к окислению полифенолами, но и влияющими на эту окислительную реакцию полифенолоксидазами. Чтобы воспрепятствовать окислению полифенола, растению необходимо иметь большое количество водорода [20].

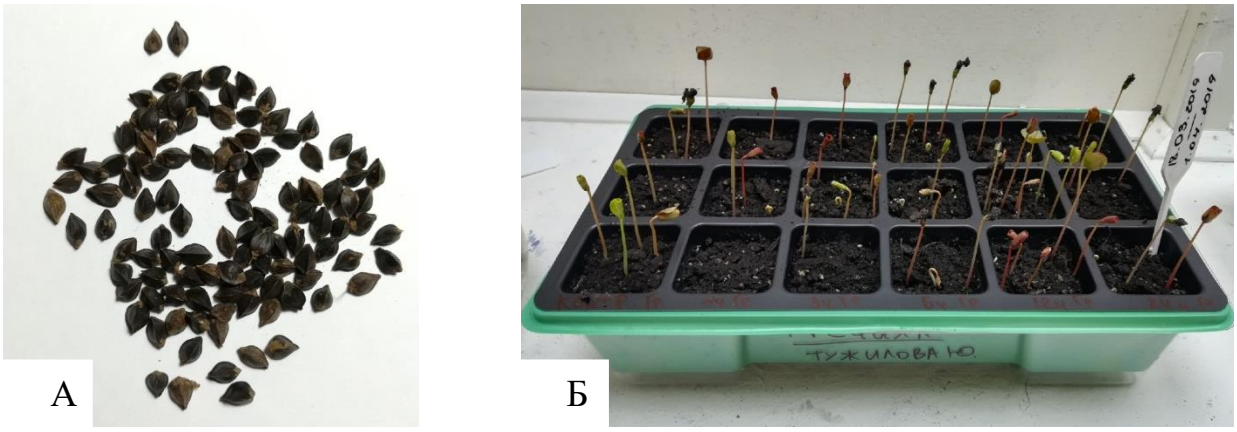
Таким образом, компоненты антиоксидантной системы имеют безусловную значимость для растения, поскольку способны не только обнаружить последствия окислительного стресса, но и предотвратить их. Это расширяет адаптационные возможности растительного организма перед неблагоприятными условиями среды, что дает еще одну возможность пережить воздействие стрессорной нагрузки.

# ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

## 1.1 Объект исследования

Исследования проводились на гречихе сорта Дикуль, районированного на территории Пензенской области.

Все эксперименты ставились на семенах (рис. 3, А) и проростках (рис. 3, Б) гречихи, выращенной в лабораторных условиях на базе Пензенского государственного педагогического университета им. В. Г. Белинского.



А Б

*Рисунок 3. Семена (А) и проростки (Б) гречихи сорта Дикуль*

Сорт универсальный, среднеспелый (вегетационный период в среднем 70-80 дней), входит в число ценных по качеству сортов[37].

Средняя урожайность сорта Дикуль составляет 19,3 центнеров с гектара на территории Пензенской области.

Гречиха относится к теплолюбивым растениям. Семена прорастают, как только почва прогреется до 8-10 °С, а для дружных всходов необходима температура 14-16°С. По этой причине высеивать ее необходимо после яровых зерновых культур, но затягивать не стоит, поскольку из-за длительного цветения и затянутого периода вегетации, гречихе свойственно неравномерное созревание. Поэтому, ранний посев семян создаст условия для ранней уборки [41].

Стоит отметить, что благодаря способности ветвится, урожайность гречихи во время заморозков не падает, поскольку на месте отмершей верхушки могут образовываться новые побеги.

Перед началом серии экспериментов была определена энергия прорастания и всхожесть семян в возрасте 7ми суток [42].

Чтобы определить всхожесть, в чашки Петри, на смоченную водой фильтровальную бумагу, помещали четыре пробы по 100 семян. Затем, по ГОСТ 12038-84 высчитывали энергию прорастания и всхожесть.

Перед проведением экспериментов, семена гречихи делили на две группы - одну готовили к проращиванию в стерильном боксе (рис.6), а другую разделяли на подгруппы в зависимости от времени предстоящего охлаждения и замачивали на 12 часов для дальнейших манипуляций.

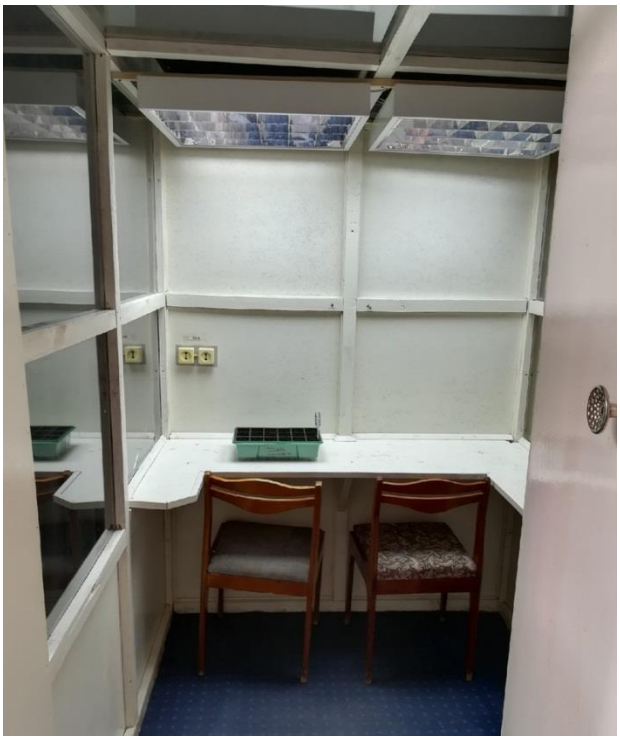


*Рисунок 4. Стерильный бокс для выращивания семян гречихи*

В стерильном боксе растения выращивали в вегетационных сосудах с универсальным по составу грунтом и относительной влажностью воздуха 70-85%. Потребность в свете удовлетворялась люминесцентными лампами, благодаря которым продолжительность светового дня составила 12 часов. Температурный режим колебался от 22 до 24°С.

В боксе проростки находились 14 дней, по истечению которых подвергались воздействию низкими положительными температурами в холодильной камере с термостатом.

## 1.2 Определение активности каталазы

Активность каталазы определяли титрометрически по методу А. Н.Баха и А.И.Опарина [35]. В основе метода лежит учет с помощью перманганата калия количества неразложившейся перекиси водорода. Для этого в ступке с кварцевым песком растирали навеску пробы (проростки и семена гречихи) массой 2 г и добавляли 3 мл воды. Чтобы смягчить кислую реакцию, добавляли на кончике шпателя карбонат кальция, пока не прекратится выделение пузырьков углекислого газа.

Далее, растертую массу переносили в мерную колбу, доводили водой до 100 мл и оставляли настояться на 30-60 минут, а после пропускали через бумажный фильтр.

На следующем этапе пипеткой брали 25 мл 0,1 н. раствора пероксида водорода и переносили в коническую колбу на 200 мл, туда же добавляли 20 мл ферментной вытяжки. Чтобы прекратить действие фермента, спустя 30 минут в колбу вливали 5 мл 10%-ного раствора серной кислоты и отправляли титровать 0,1 н. раствором перманганата калия, пока не появится устойчивый в течение 1 минуты розовый окрас.

Одновременно с этим ставили контроль с ферментным раствором (20 мл), который инактивировали нагреванием в кипящей бане в течение 5 мин. Затем, раствор охлаждали, добавили 25 мл 0,1 н. раствора $H_2O_2$ и оставляли настаиваться в течении 30 минут. Далее вносили 5 мл 10% - ного раствора серной кислоты и с помощью установки на рис. 5 титровали 0,1 н раствором перманганата калия, помечая в мл то количество перманганата калия, которое ушло на титрование всего пероксида водорода.

Количество перманганата, равное количеству пероксид водорода разложившегося под действием ферментов, находили по разнице между опытным и контрольным титрованием.

Расчет количества пероксида водорода, разложенного ферментом, вели, исходя из того, что 1 мл 0,1 н. раствора перманганата калия соответствует 1,7 мл пероксида водорода. [45].

Активность каталазы выражали в мкмоль $H_2O_2$/(мг белка мин).

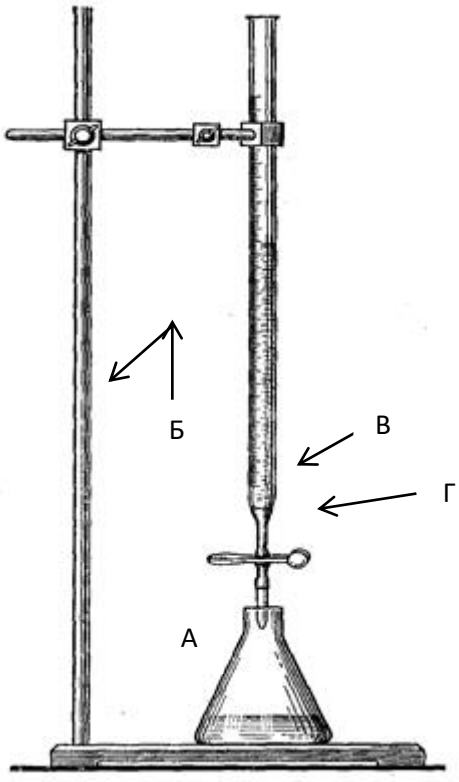



*Рисунок 5. Схематичное изображение установки для титрования*
*А- штатив; Б- кран с зажимом;*
*В- бюретка; Г- колба.*

### 1.3 Определение содержания пролина

Содержание свободного пролина определяли с помощью методики Бэйтса [51]. Данный метод основан на взаимодействии свободного пролина с нингидриновым реактивом, образующим розово-красную окраску.

Навеску ткани исследуемого материала массой 300 мг переносили в фарфоровую ступку и пестиком гомогенизировали с добавлением 10 мл 3%-ного раствора сульфосалициловой кислоты.

Гомогенат переливали в центрифужные пробирки и в течение 10 мин центрифугировали при 5000 g. Затем, к 2 мл супернатанта в реакционной пробирке добавляли 2 мл нингидринового реактива и 2 мл ледяной уксусной кислоты.

Пробирки закрывали пробкой с притертыми пробками и выдерживали 1 ч на кипящей водяной бане. Далее пробы охлаждали до комнатной температуры, прибавляли к содержимому по 4 мл толуола и тщательно перемешивали встряхиванием.

Верхний слой толуола, содержащий окрашенный комплекс пролин-нингидрин (рис. 8), отделяли от водной фазы, и колориметрировали на ФЭК-56-М (производство России) при 490 нм.

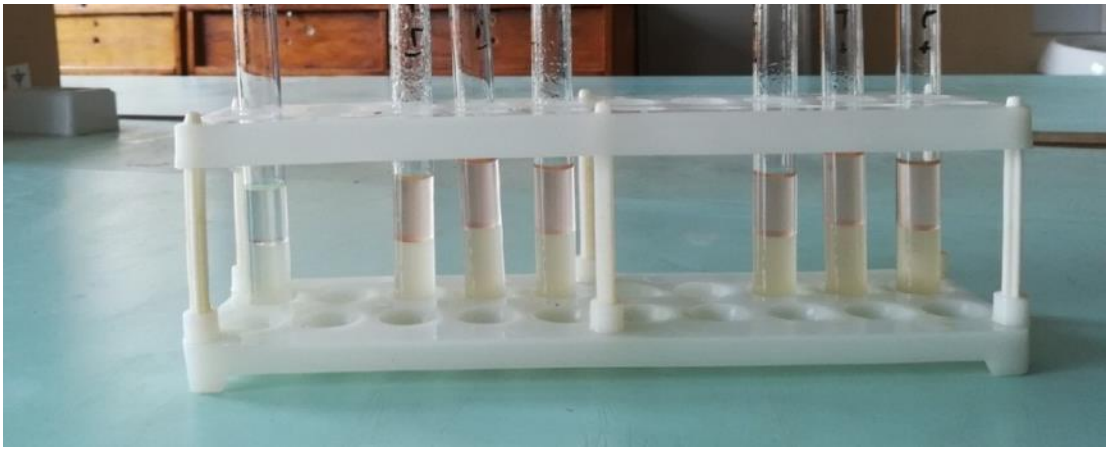


*Рисунок 6. Окрашивание толуола комплексом пролин-нингидрин*

Содержание свободного пролина определяли по калибровочной кривой (рис. 7), построенной с использованием растворов пролина в диапазоне концентраций от 50 до 150 мкг/мл, и выражали в микрограммах на 1 г сырой массы.

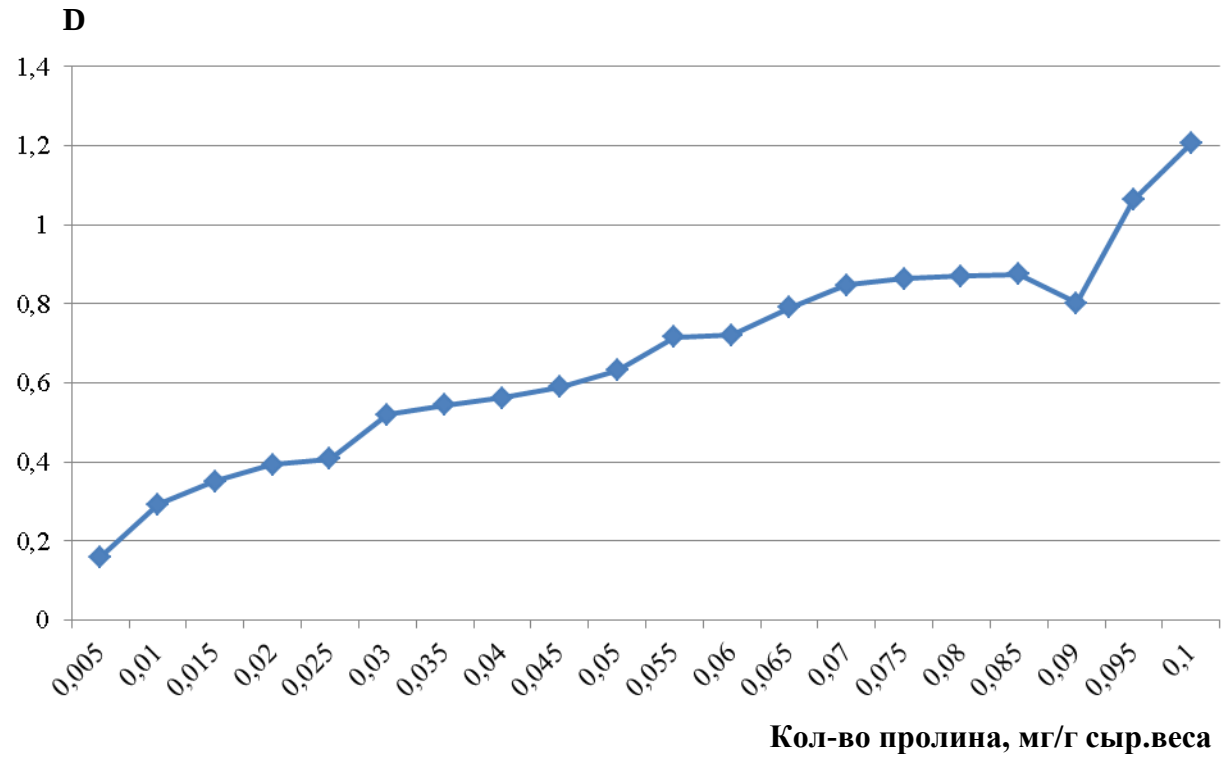



*Рисунок 7. Калибровочная кривая содержания пролина в мг/г сырого веса*

### 1.4 Определение активности полифенолоксидазы

Активность полифенолоксидазы определяли по методу Бояркина. Для этого брали навеску растительного материала (семена или проростки гречихи) массой 100 мг и растирали пестиком в фарфоровой ступке (рис. 9, А) с добавлением 5 мл 0,06 М фосфатного буфера с pH 6,7. Полученную массу перекладывали в мерную колбу на 50 мл и тем же буфером доводили до метки. Тщательно перемешав, раствор оставляли на 15 минут настаиваться, а затем через двойной бумажный фильтр переливали в стаканчик (рис. 9, Б).

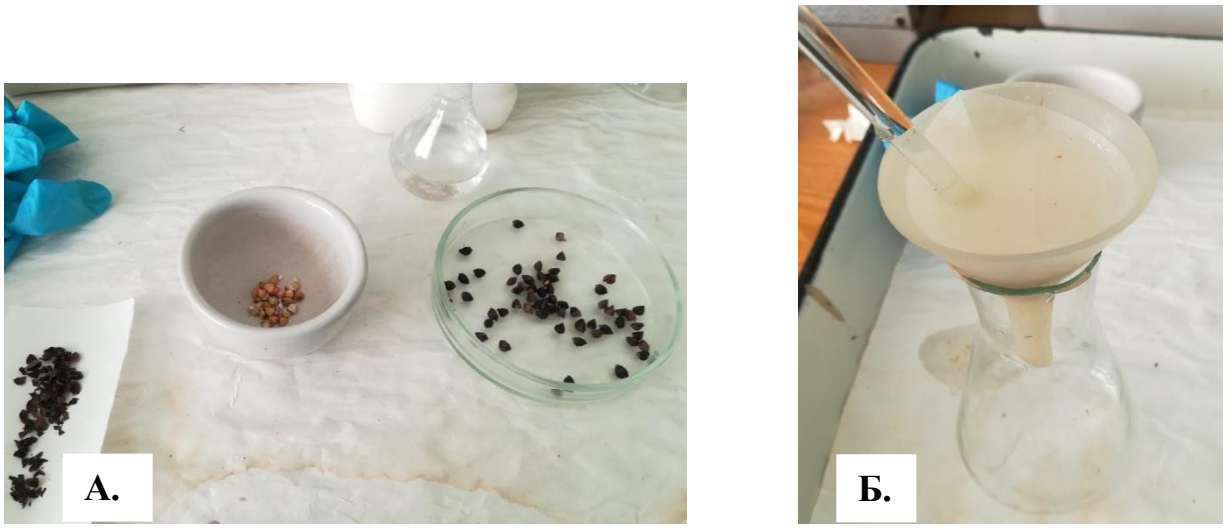



*Рисунок 9. А- Процесс приготовления навески; Б- Фильтрация приготовленного раствора через бумажный фильтр*

Для определения активности фермента использовали полученную вытяжку (фильтрат). Активность фермента измеряли на спектрофотометре (рис. 10) при длине волны 440 нм.

*Рисунок. 10. Спектрофотометр Verian Cary 50*

А после, строили график зависимости оптической плотности (D440) от времени, и находили линейный участок, благодаря которому вычисляли скорость изменения оптической плотности раствора по фомуле:

$D'440 = (D440_2 - D440_1) / (t_2 - t_1)$

Активность пероксидазы рассчитывали по формуле:

$$АПО = \frac{D' * N}{m_{сыр.} * l_{кюв.}} \quad \left[\frac{\text{(ед. опт. плотн.)}}{\text{(г сыр.массы) * (сек)}}\right]$$

D’440 – скорость изменения оптической плотности [ед.опт.плот. / сек]

N – разведение, N = Vколбы / Vпробы (учитывает, какую долю всего экстракта измерили)

mсыр. – сырая масса навески [г]

lкюв. – толщина кюветы [см]

## 1.5 Определение активности пероксидазы

Активность пероксидазы определяли по методу Бояркина, который основан на измерении временного промежутка, за который опытный раствор приобретет необходимую оптическую плотность. Субстратом для реакции служит бензидин, который окисляясь, дает соединение с синей окраской.

Для начала, 100 мг растительного материала растирали в ступке с ацетатным буферным раствором pH 5,4 после чего перекладывали содержимое в мерную колбу и доводили до отметки 25 мл. Получившуюся вытяжку настаивали в течении 5-10 минут и центрифугировали на 3000 оборотах в минуту на протяжении 10 минут. Для определения активности пероксидазы использовали надосадочную жидкость, в которой содержался бензидин, окисляющийся со временем.

Контролем служил раствор, приготовленный следующим образом - две трети сосуда на 200 мл заполняли дистиллированной водой и вносили туда 2,3 мл ледяной уксусной кислоты и 184 мг бензидина. Затем, на водяной бане прогревали содержимое сосуда до температуры в 50-60°С (рис. 11).

После того, как весь бензидин растворился, добавляли 5,45 г ацетата. Для измерений использовали спектрофотометр при длине волны 590 нм.

*Рисунок 11. Прогревание контрольного раствора на водяной бане*

Активность пероксидазы рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{D \cdot a \cdot y}{t \cdot d}$$ , где

*A* - активность фермента, г/с

*D* - оптическая плотность, зарегистрированная в опыте

*t* - время, с

*y* – степень постоянного разведения вытяжки в кювете (для данного опыта она составляет 4)

*a*- Отношение взятой для приготовления вытяжки воды в мл, к массе навески в г.

Активность пероксидазы выражается в единицах на 1 г сырого веса за секунду.

## 1.6 Методы статистической обработки данных

Опыты выполнялись в трех повторностях. В качестве статистической обработки данных использовался анализ ошибки средней и расчет критерия Стьюдента.

# ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

К новым условиям среды растительному организму помогает приспособиться комплекс реакций, вызванный холодовым шоком, который является фактором стресса. К числу таких реакций относят изменение активности антиоксидантных ферментов, которые обеспечивают клетке максимальную защиту от воздействия окислительного стресса.

Антиоксидантная система содержит разнообразные высоко- и низкомолекулярные соединения, связывающие и нейтрализующие свободные радикалы, а также источники их возникновения.

## 1.1 Действие низких положительных температур на активность пероксидаз в семенах и проростках гречихи

В результате экспериментов по исследованию активности пероксидазы в зеленой массе проростков гречихи, был составлен график, из которого видно, что наиболее низкая активность фермента приходится на контрольные группы. Связано это с отсутствием воздействия низких температур на растения.

Однако в пробах, которые подвергались охлаждению в течение 1, 3, 6, 12 и 24 часов, активность пероксидазы относительно контроля повышалась на 5%, 16%, 33%, 51% и 68% соответственно.

Объясняется такое поведение фермента ответом организма на холодовое повреждение, которое вызвало десорбцию пероксидазы и ослабление адсорбирующей способности связывающих ее структур, что привело к освобождению фермента.

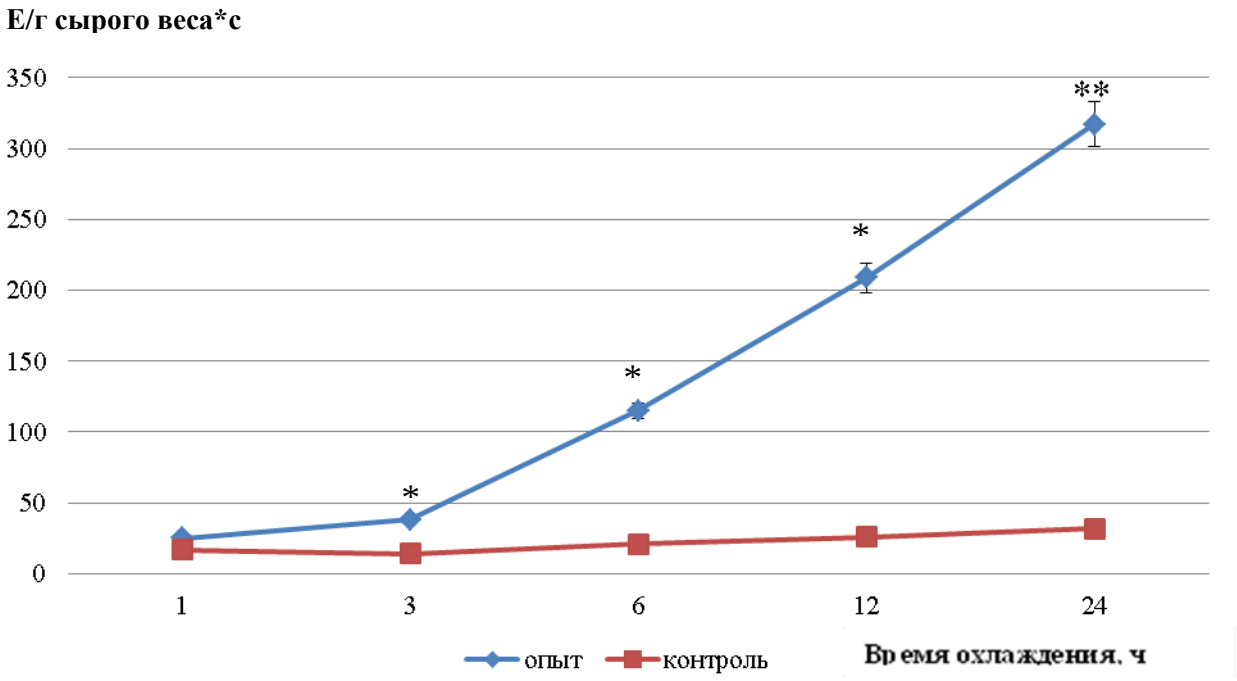



*Рисунок 12. Влияние температуры +4°С на активность пероксидаз в проростках гречихи, Е/г сырого веса*с (M±m, n=3; * - p < 0,05 относительно контроля)*

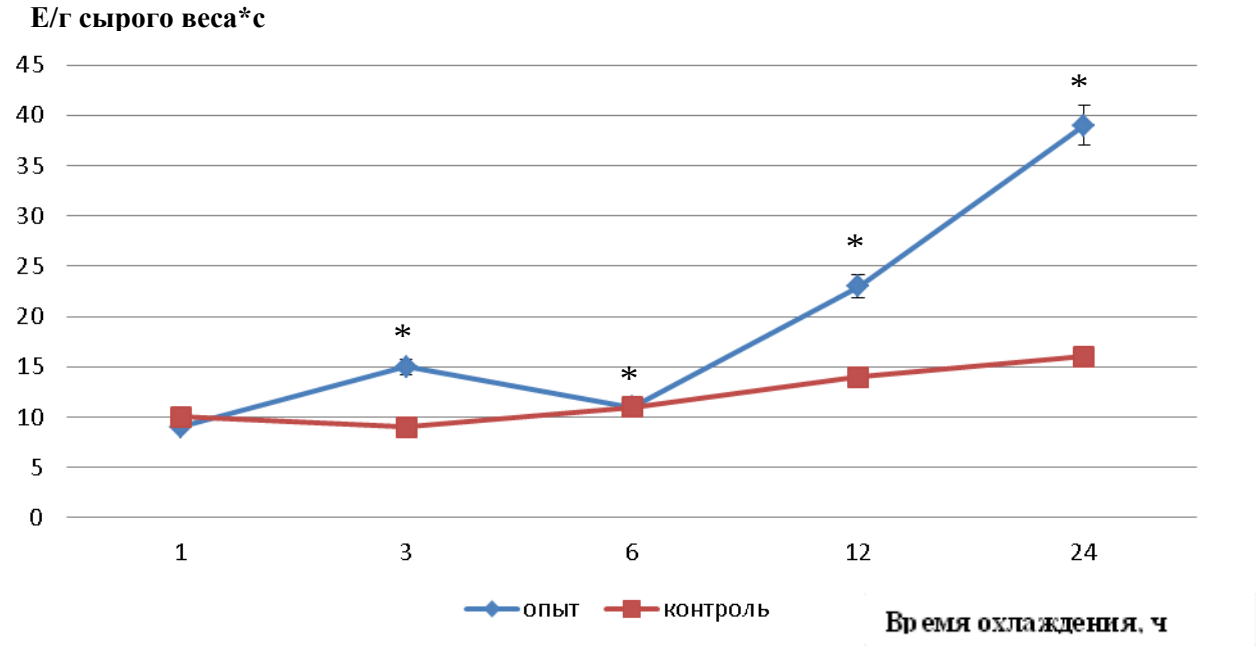



*Рисунок 13. Влияние температуры +4°С на активность пероксидаз в семенах гречихи, Е/г сырого веса·с (M±m, n=3; * - p < 0,05 относительно контроля)*

Поскольку пероксидазы обладают высоким сродством к $H_2O_2$ и способны нейтрализовать даже его малые концентрации, то при длительной гипотермии, когда содержание каталазы в тканях было снижено, образующаяся перекись водорода утилизировалась за счет действия пероксидаз. Поэтому можно сделать вывод, что нейтрализация $H_2O_2$ в течение всего периода переохлаждения данным ферментом, является механизмом адаптации растения к изменяющимся условиям среды.

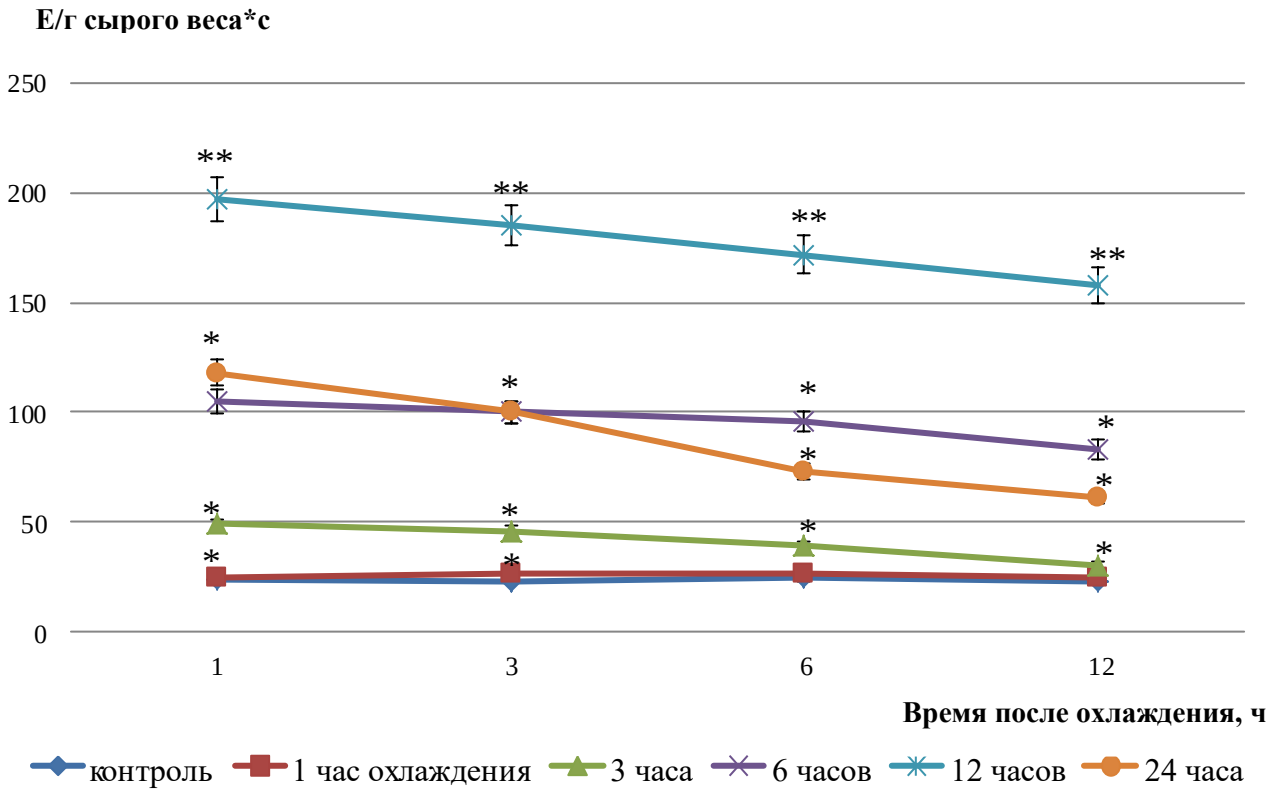



*Рисунок 14. График изменения активности пероксидазы в проростках гречихи после низкотемпературных воздействий (M±m, n=3; * - p < 0,05 относительно контроля).*

После прекращения низкотемпературного воздействия, максимальное количество пероксидазы наблюдалось в первый час адаптации растения (рис. 14), и со временем снижалось, приближаясь к контрольным значениям, у растений, перенесших гипотермию длительностью в 1 час и 3 часа.

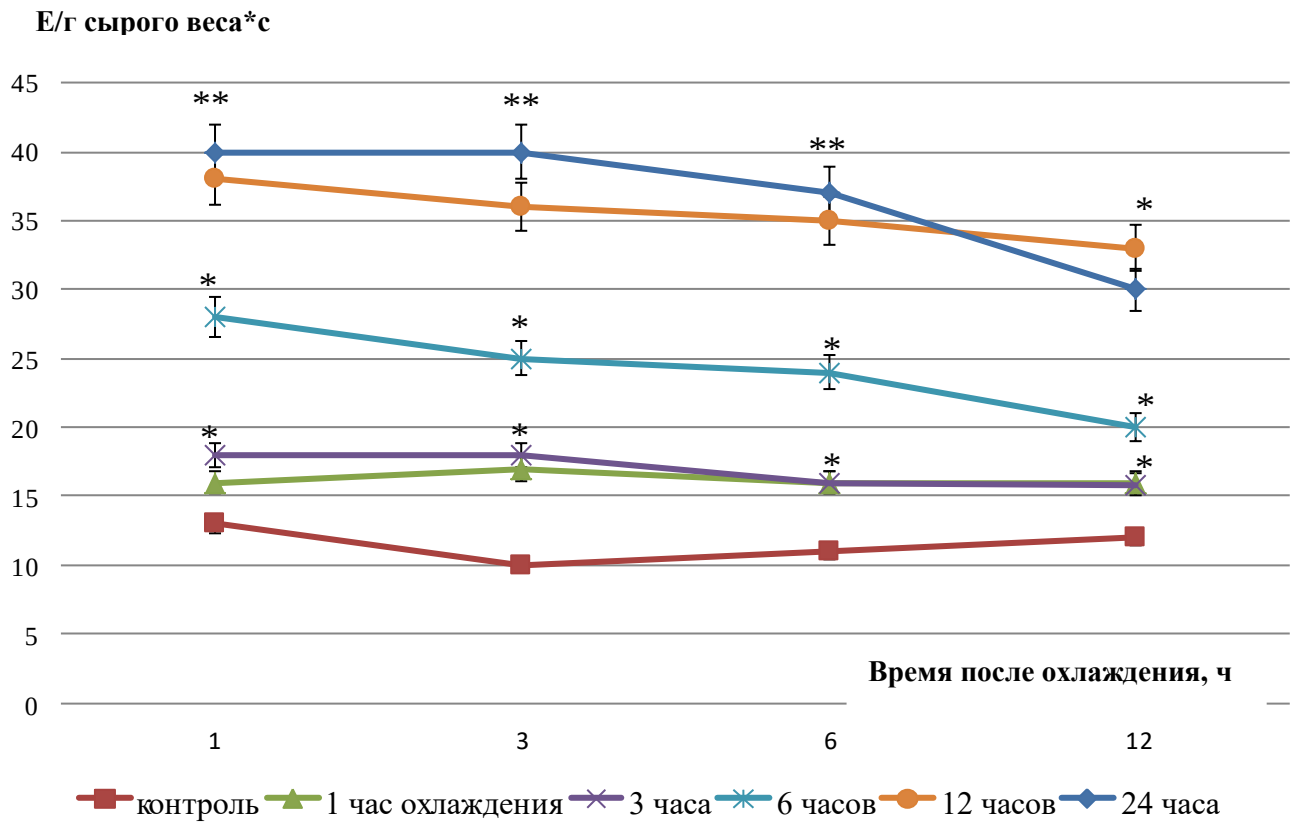



*Рисунок 15. График изменения активности пероксидазы в семенах гречихи после низкотемпературных воздействий (M±m, n=3; * - p < 0,05 относительно контроля).*

Это связано с уменьшением количества пероксида водорода в клетках растения и активации механизмов защиты.

Семена оказались наиболее уязвимыми для НПТ, поскольку не обладают защитным потенциалом взрослого растения, и в результате испытанного стресса, была отмечена остановка ростовых процессов после 6 и 12 часовой гипотермии, который не наблюдался у контрольной группы семян того же возраста (рис 15).

## 1.2 Действие низких положительных температур на активность полифенолоксидазы в семенах и проростках гречихи

Как и в предыдущем опыте, исследования активности полифенолоксидазы зеленой массы гречихи показали низкое содержание фермента в контроле.

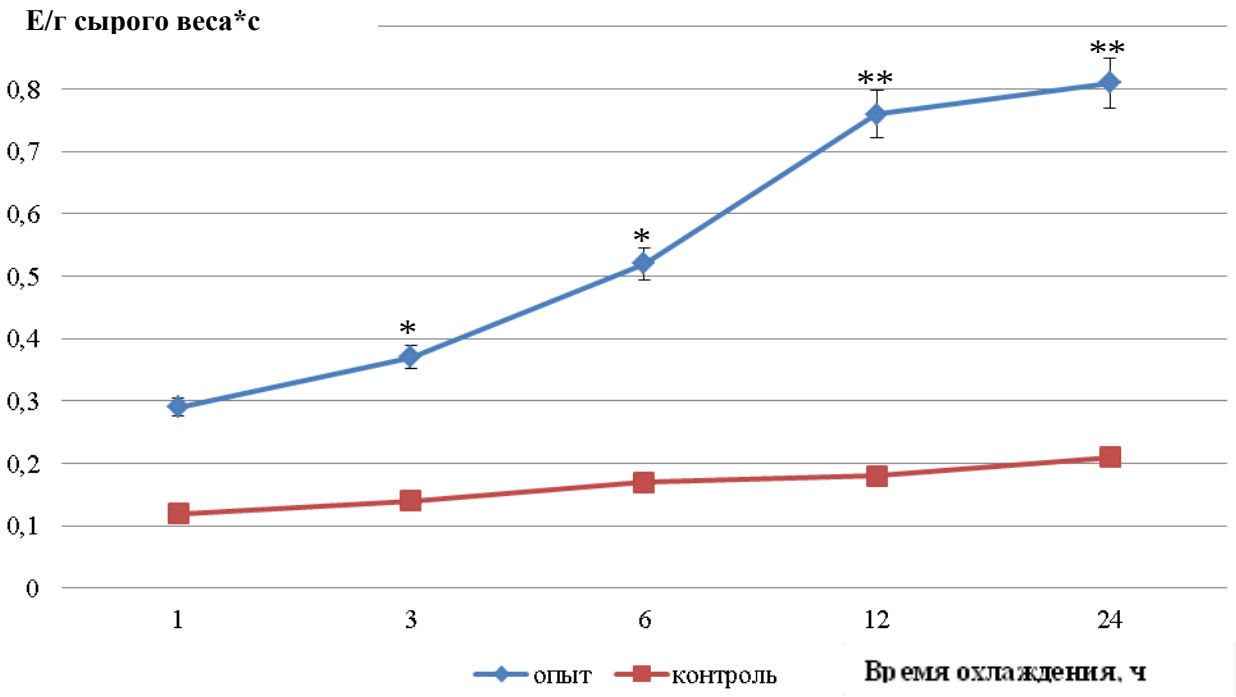



*Рисунок 16. Влияние температуры +4°С на активность полифенолоксидаз в проростках гречихи, Е/г сырого веса*с (M±m, n=3; * - p < 0,05 относительно контроля)*

В опытных пробах, подвергавшихся воздействию низких положительных температур (+ 4°С) на протяжении 1, 3, 6, 12 и 24 часов (рис. 16), активность ПФО относительно контроля, начиная с 6 часов возрастала в 3 и 4 раза соответственно.

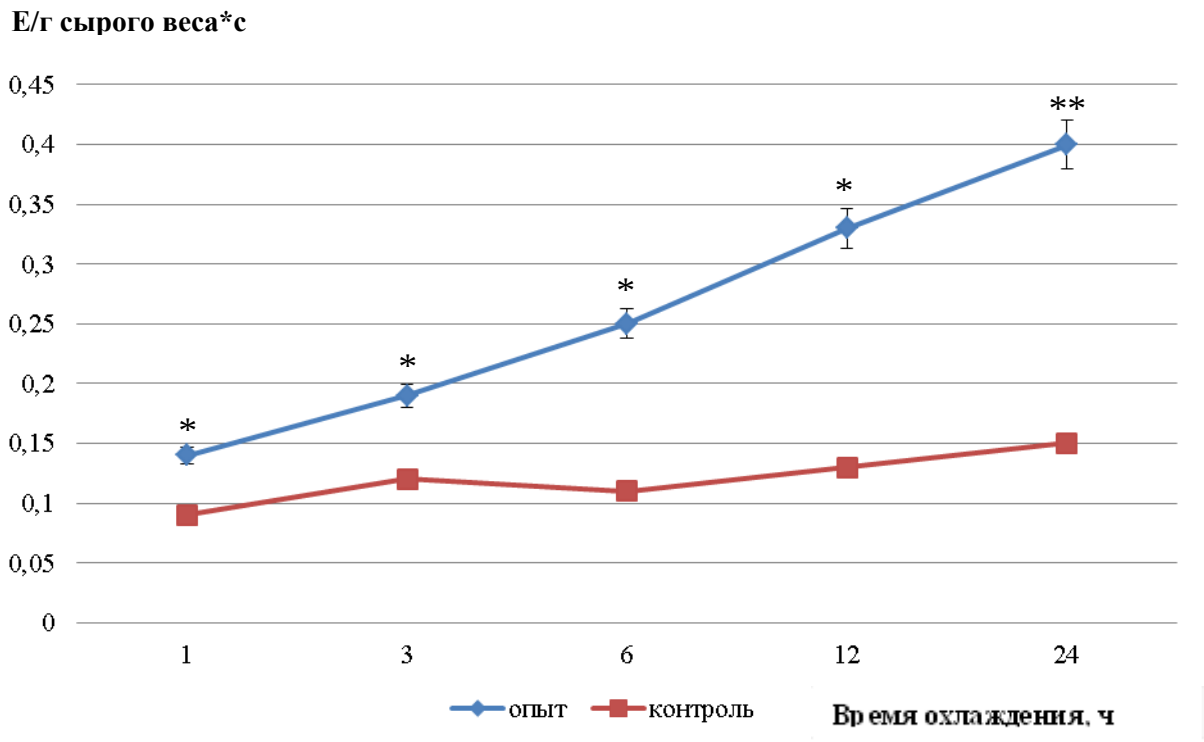



*Рисунок 17. Влияние температуры +4°С на активность полифенолоксидаз в семенах гречихи, Е/г сырого веса*с (M±m, n=3; * - p<0,05 относительно контроля)*

Можно сделать вывод, что степень повышения активности полифенолоксидазы при длительном охлаждении растений гречихи связана с развитием окислительного стресса.

В семенах (рис. 17), действие НПТ выражалось в повышении активности фермента с 0,14 до 0,4 е/г сырого веса*с в течение 24х часов, в контроле за тоже время активность полифенолоксидазы выросла с 0,09 до 0,15 е/г сырого веса*с, что связано с нормальным развитием семени.

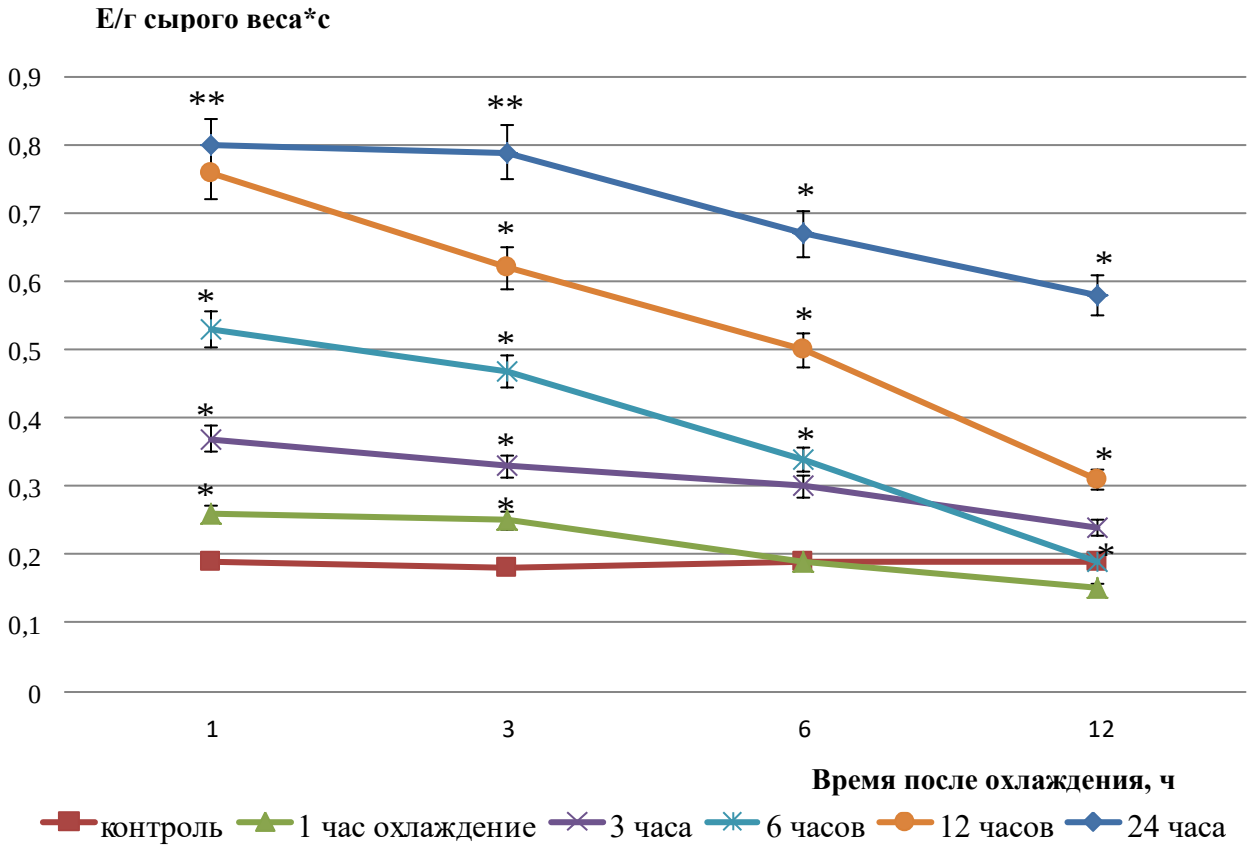



*Рисунок 18. График изменения активности полифенолоксидазы в проростках гречихи после низкотемпературных воздействий (M±m, n=3; * - p < 0,05 относительно контроля).*

На графике из рис. 18 видно, что температура +4°С не оказала губительного воздействия на молодые проростки гречихи, и после 3х часов с момента устранения стрессового фактора, растительный организм начал восстанавливаться, о чем свидетельствует снижение концентрации $H_2O_2$ в тканях и, следовательно, постепенное снижение активности пероксидазы с 0,79 до 0,58 е/г сырого веса*с. Это адаптация растительного организма к изменениям внешней среды, направленная на устранение окислительного стресса и холодового повреждения.

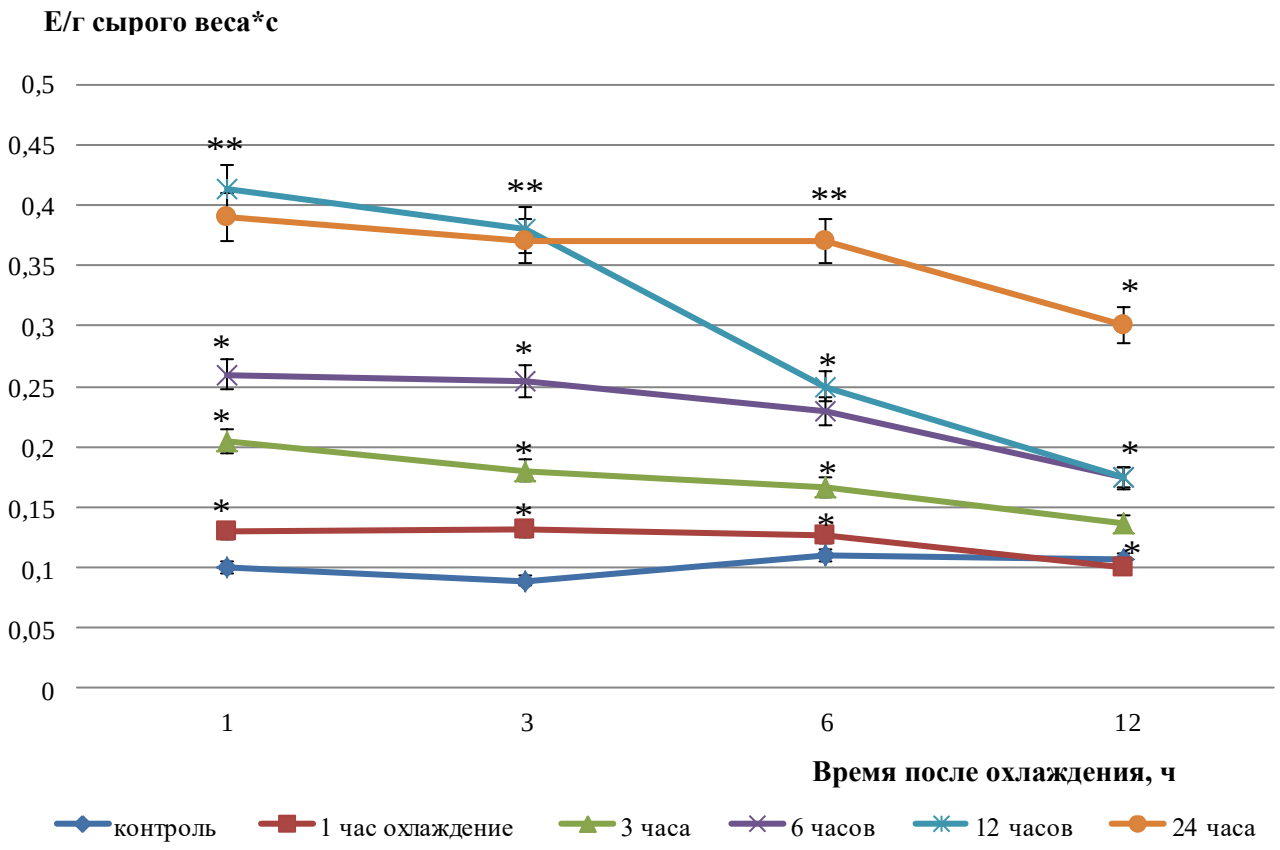



*Рисунок 19. Изменения активности полифенолоксидазы в семенах гречихи после низкотемпературных воздействий (M±m, n=3; * - p < 0,05 относительно контроля).*

Из графика на рис.19 заметно, что резких колебаний показателей активности полифенооксидазы не происходит, а на временном отрезке от 3х до 6 часов и вовсе остается равной 0,37 е/г сырого веса*с. Своего минимального значения в 0,3 е/г сырого веса*с активность фермента достигает спустя 12 часов после начала периода восстановления.

Предположительно, это связано не только с уменьшением количества пероксида водорода в тканях, но и с участием полифенолоксидазы в репарационных процессах и прорастании семени.

## 1.3 Содержание пролина в семенах и проростках гречихи в условиях низкотемпературного воздействия

В борьбе против негативного воздействия АФК на клетки растений, вместе с антиоксидантными ферментами участвуют соединения неферментативной природы, к которым относится пролин - многофункциональный стрессовый метаболит. Благодаря его способности накапливаться в клетках, он является неспецифической защитой растений от всевозможных факторов стресса, среди которых и низкие температуры.

Как показало исследование, низкие положительные температуры оказывают существенное влияние не только на количество пролина в семенах и проростках гречихи, но и на скорость его накопления.

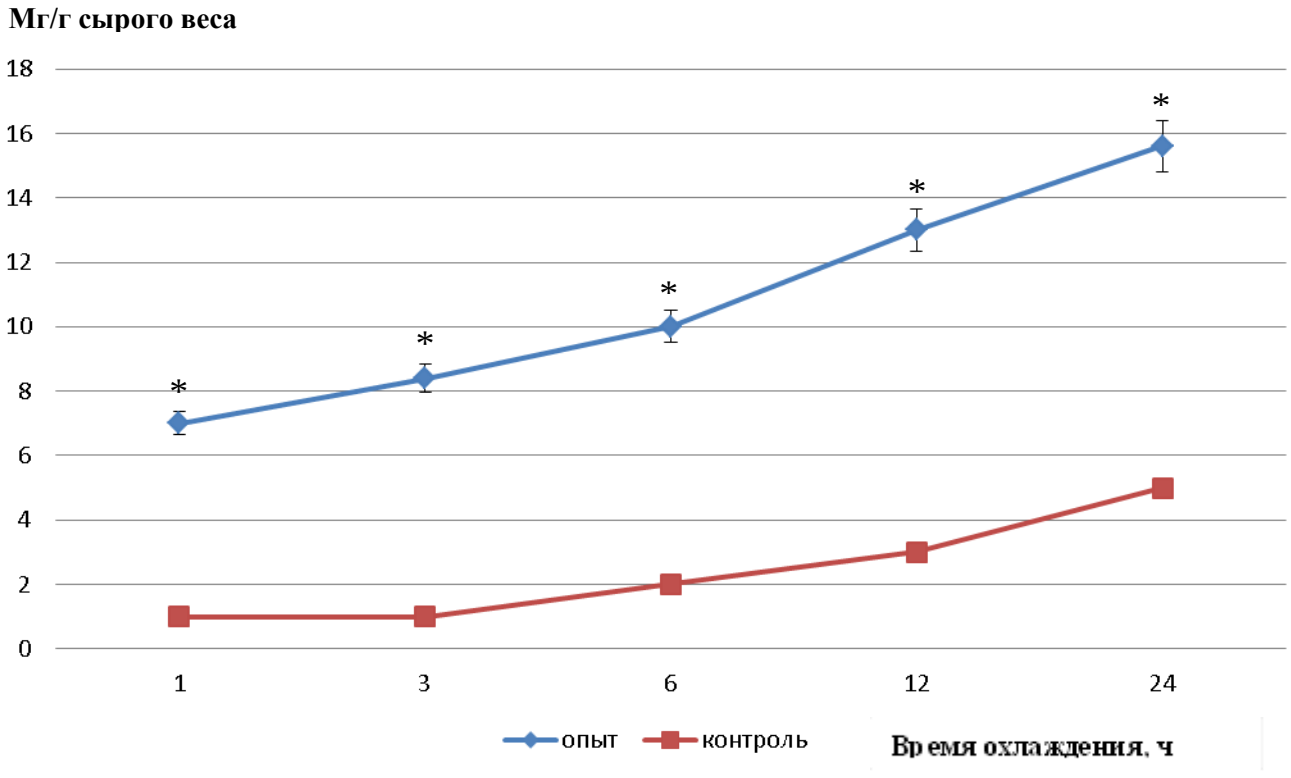



*Рисунок 20. Влияние температуры +4°С на содержание пролина в проростках, Мг/г сырого веса*с (M±m, n=3; * - p < 0,05 относительно контроля)*

По графику на рис.20 видно, что чем дольше проростки гречихи находились под влиянием низких температур, тем больше накапливался в их тканях пролин, поскольку он является компонентом антиоксидантной системы и играет главную роль в ее первичных стрессовых реакций, а также в адаптации растения к новым условиям среды.

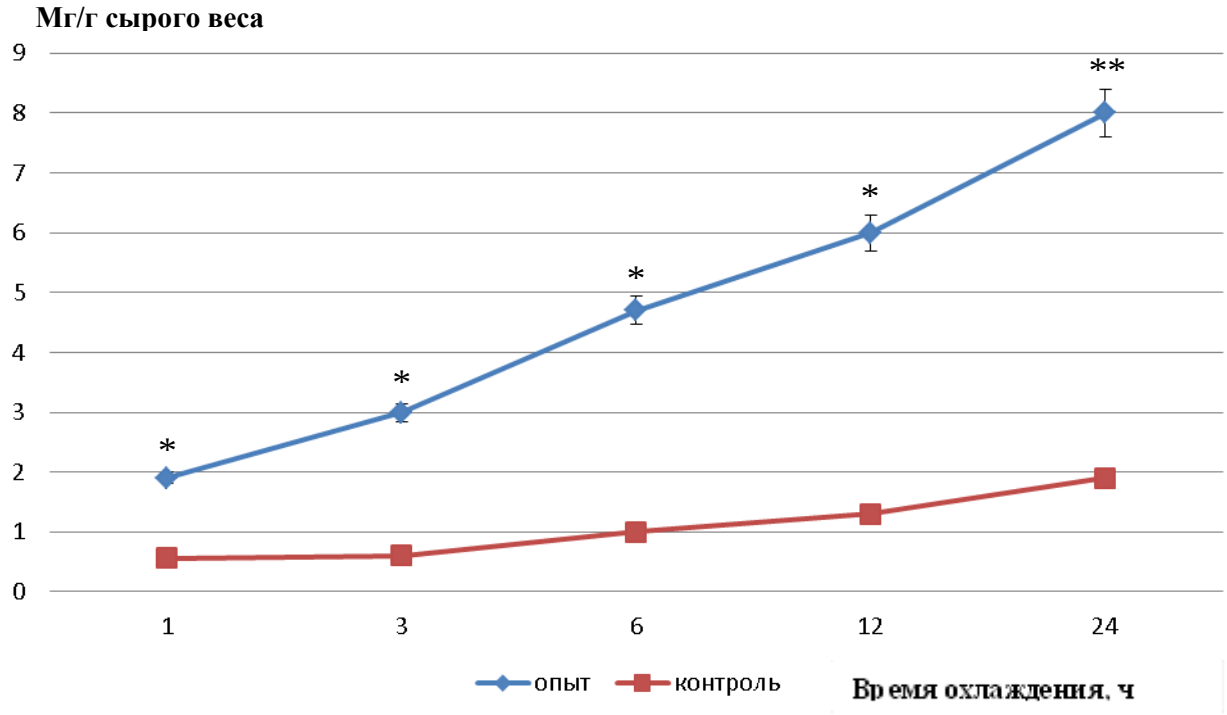



*Рисунок 21. Влияние температуры +4°С на содержание пролина в семенах гречихи, Мг/г сырого веса*с (M±m, n=3; * - p < 0,05 относительно контроля)*

Через 3 часа после начала эксперимента с низкотемпературным воздействием, содержание иминокислоты в семенах (рис. 21) поднялось в 5 раз по сравнению с контролем, а через 24 часа этот показатель увеличился в 6 раз. Увеличение количества пролина в контрольных образцах через 24 часа может быть связано с достижением критического порога оводненности в 60% и началом гидролиза запасных веществ эндосперма.

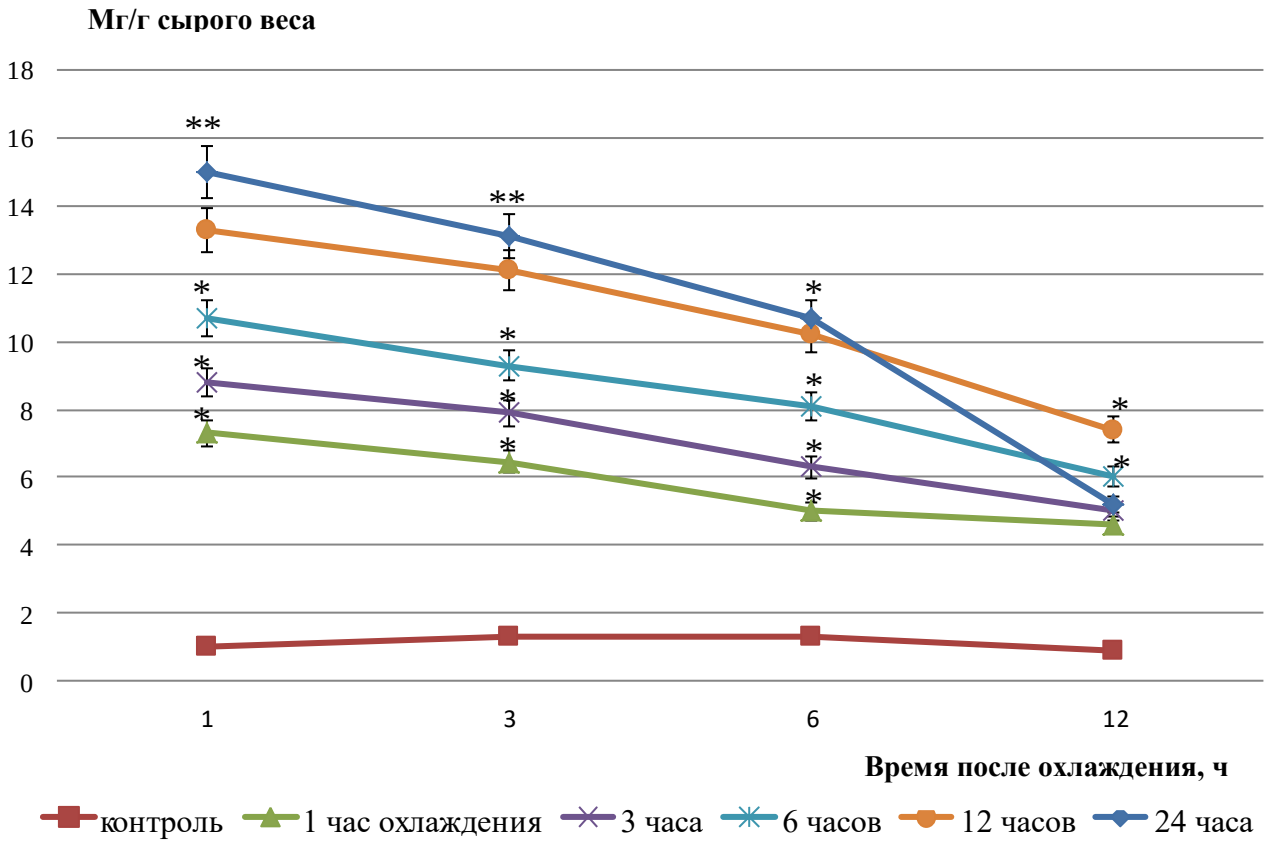



*Рисунок 22. Изменения содержания пролина в проростках гречихи после низкотемпературных воздействий (M±m, n=3; * - p < 0,05 относительно контроля).*

На рис.22 показано, как изменялось содержание пролина в проростках гречихи после прекращения гипотермии. После трех часов восстановления, количество пролина упало с 15 до 13,1 мг/г сырого веса, и продолжало уменьшаться на протяжении следующих девяти часов, достигнув значения в 5,2 мг/г сырого веса. Это может быть объяснено тем, что на протяжении 3х часов растения еще могли адекватно реагировать на низкие температуры, но со временем, их ресурсы истощились, что привело к некорректной работе антиоксидантной системы и снижению содержания пролина.

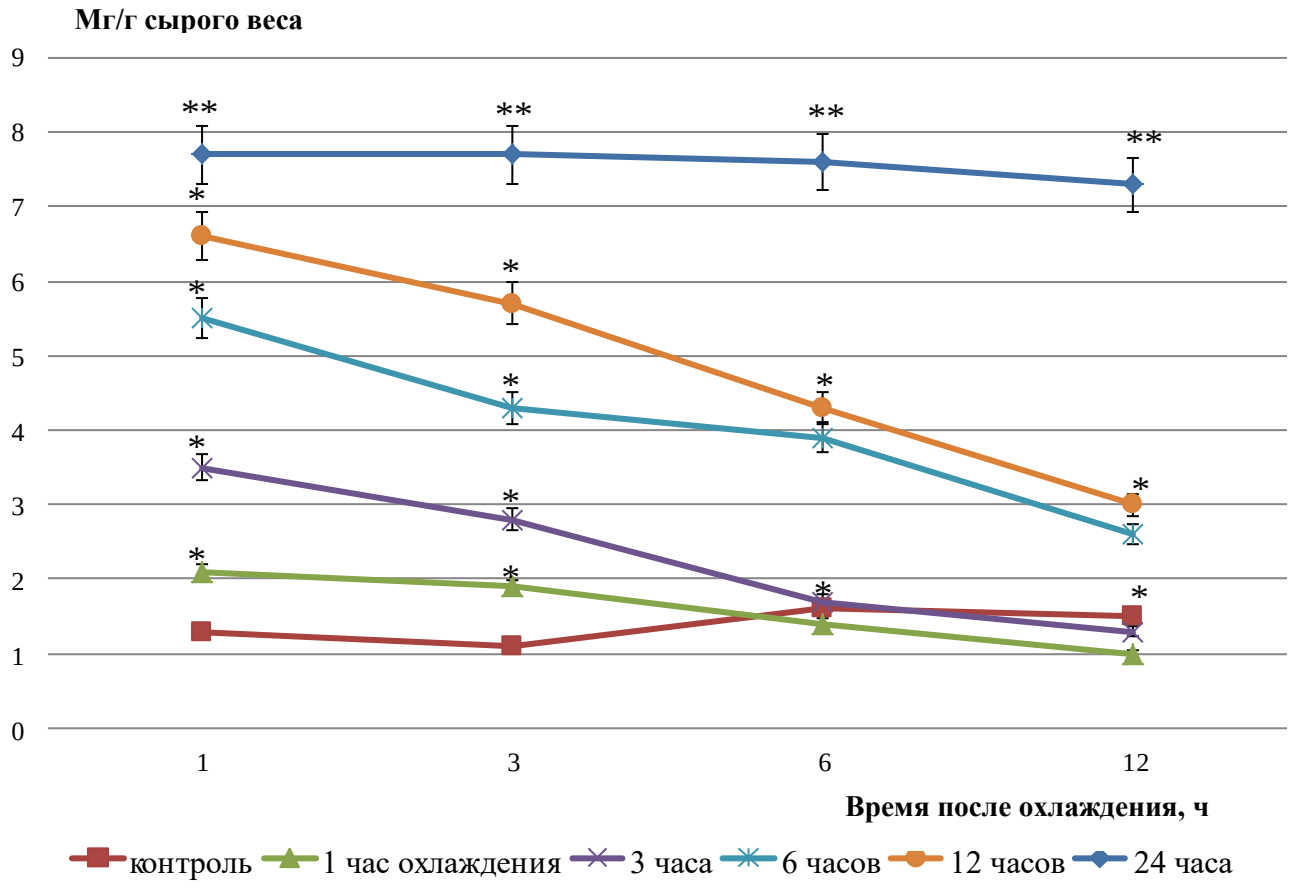



*Рисунок 23. График изменения содержания пролина в семенах гречихи после низкотемпературных воздействий (M±m, n=3; * - p < 0,05 относительно контроля).*

В семенах гречихи, как видно из рис.23 содержание пролина было стабильным на протяжении первых трех часов и начало снижаться лишь через 6 часов с 7,7 до 7,6 мг/г сырого веса, а через двенадцать часов значение упало до 7,3 мг/г сырого веса. Связано это с тем, что основным запасным веществом в семени гречихи выступает белок, который в процессе онтогенеза гидролизуется, освобождая, в том числе и пролин, который участвует не только процессе роста, но и в защите от гипотермии. В результате продолжительного охлаждения более 6ти часов, ростовые процессы в семени замерли, и содержание пролина стало снижаться.

## 1.4 Содержание каталазы в семенах и проростках гречихи в условиях низкотемпературного воздействия

Поскольку в инактивации $H_2O_2$ каталаза играет важную роль, то ее количество в зеленой массе и семенах гречихи варьировалось в зависимости от содержания пероксида водорода, поскольку данный фермент обладает уникальным свойством утилизации перекиси водорода без участия восстановленных клеточных эквивалентов, а значит, механизм этой реакции наименее энергозатратен по сравнению с другими.

Следовательно, когда в результате холодового повреждения у растения наступает окислительный стресс и создается дефицит энергии, сопряженный с увеличением содержания активных форм кислорода в клетках (в том числе и $H_2O_2$ ), то разложение перекиси водорода с минимальной затратой энергии, позволяет сохранить восстановленные эквиваленты, а также энергетические ресурсы для синтеза протекторных белков и липидов.

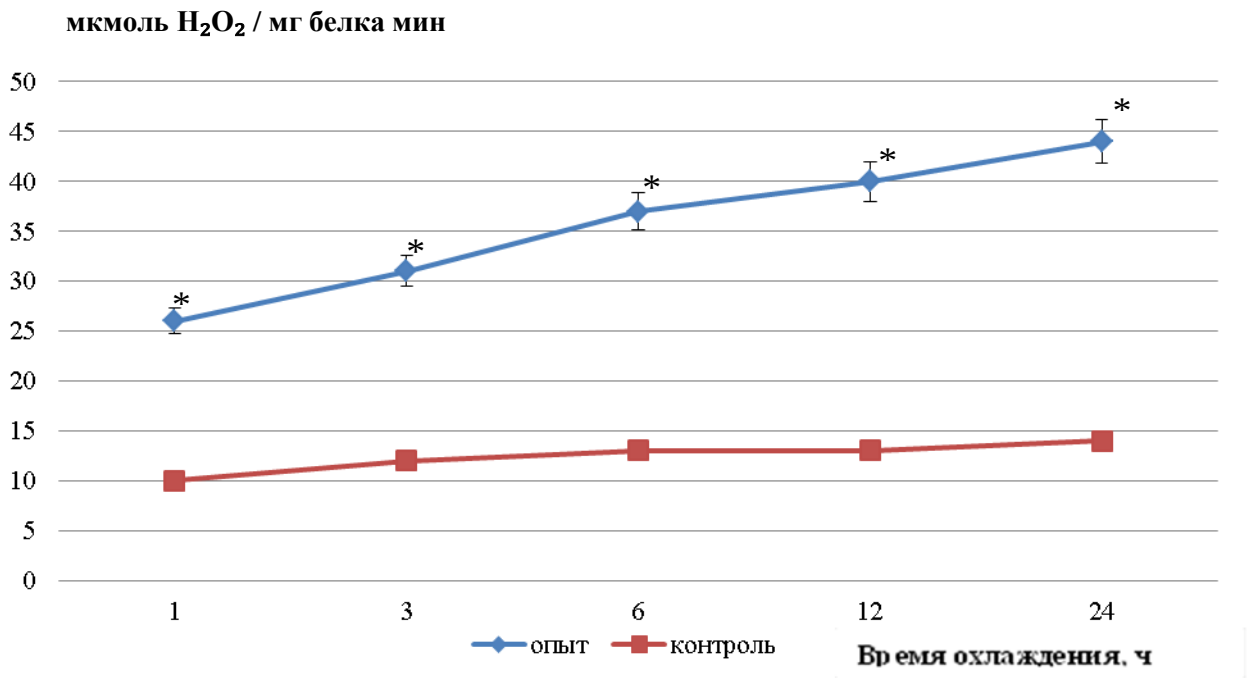



*Рисунок 24. Влияние температуры +4°С на активность каталазы в проростках гречихи, мкмоль $H_2O_2$ / мг белка мин (M±m, n=3; * - p < 0,05 относительно контроля)*

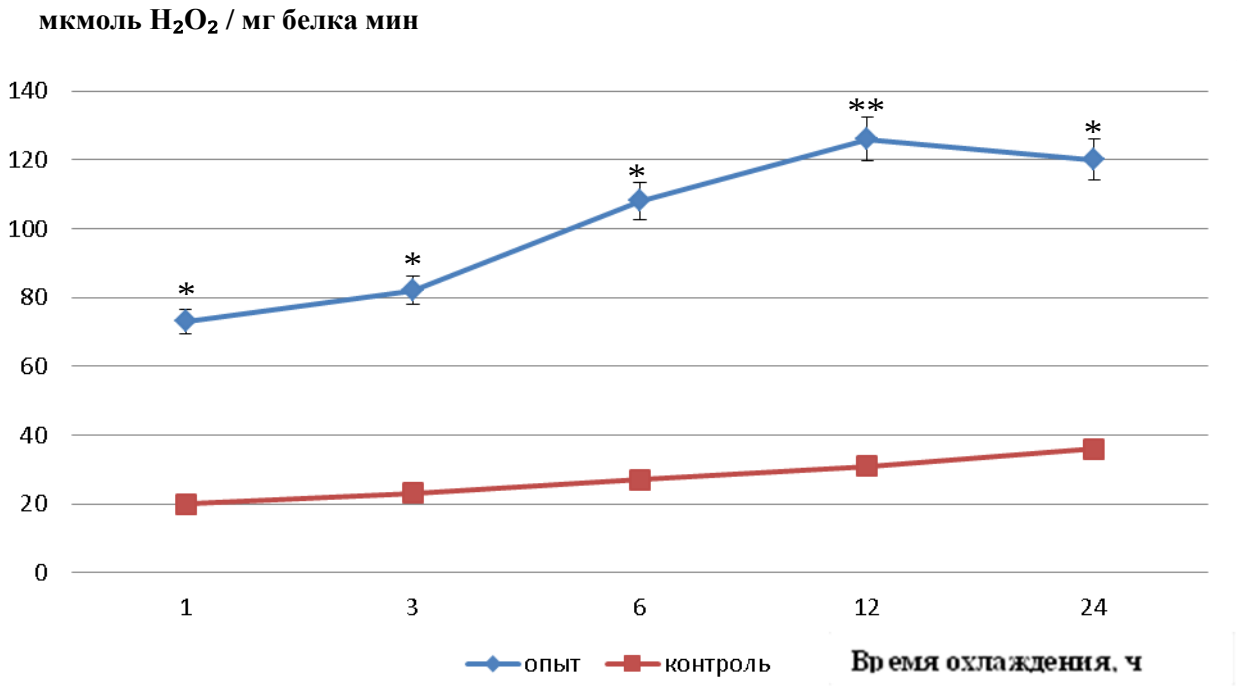



*Рисунок 25. Влияние температуры +4°С на активность каталазы в семенах гречихи, мкмоль $H_2O_2$ / мг белка мин (M±m, n=3; * - p < 0,05 относительно контроля)*

Как показал эксперимент, при трехчасовом низкотемпературном воздействии содержание каталазы в листьях (рис.24) выросло на 20% по сравнению с контролем, а в семенах (рис. 25) на 11%. После двенадцати часов охлаждения, этот показатель составил 56% в проростках и 19% в семенах, однако при более продолжительном воздействии низких температур, начал снижаться.

Отсюда можно сделать вывод, что кратковременный температурный стресс, в большей степени влияет на рост активности фермента, чем длительный.

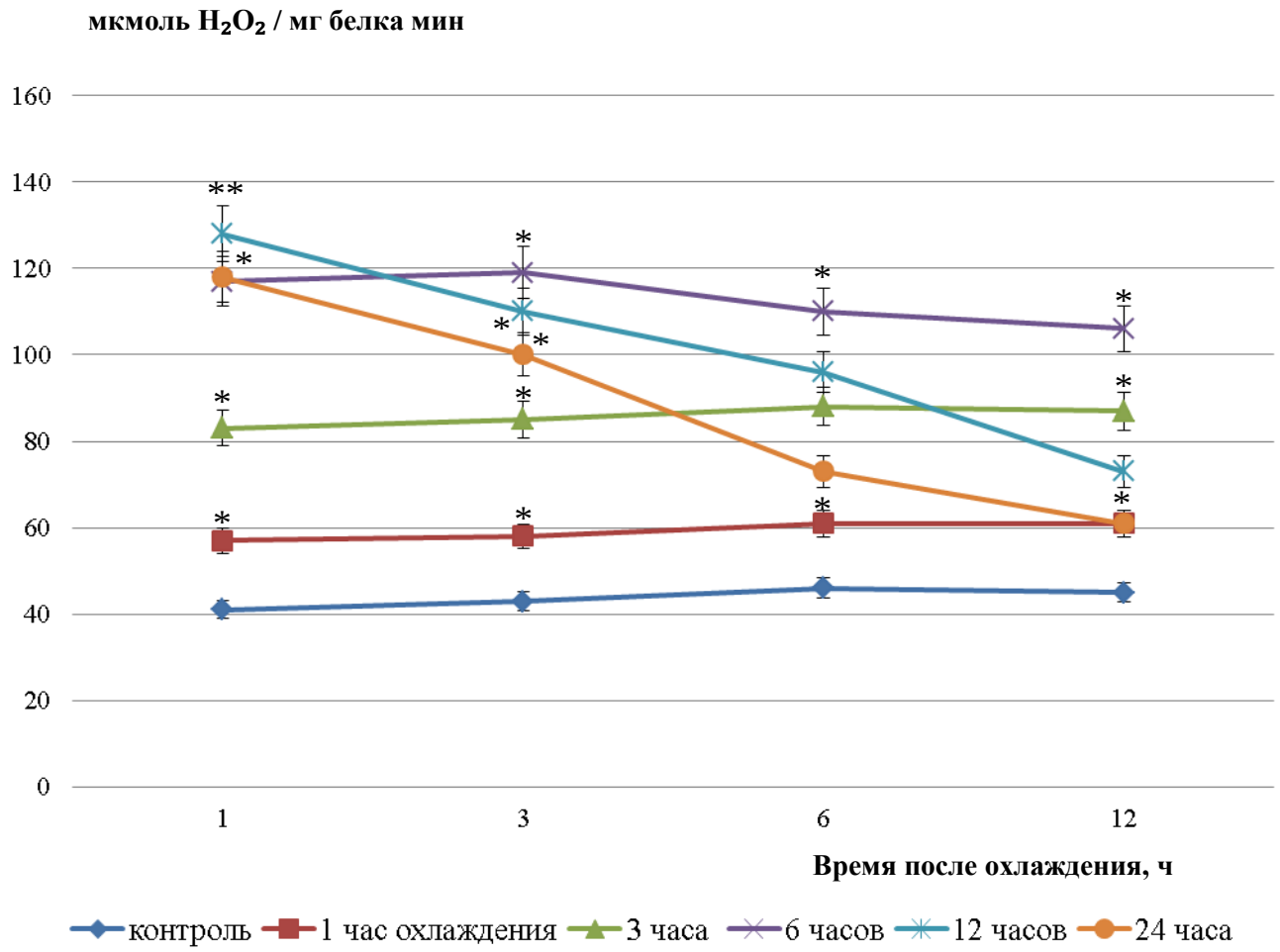



*Рисунок 26. Изменения активности каталазы в семенах гречихи после низкотемпературных воздействий (M±m, n=3; * - p < 0,05 относительно контроля).*

В семенах восстановление (рис.26) после холодового стресса протекает не однозначно. Минимальная разница в значениях наблюдалась в пробах, которые охлаждались 1 час и 3 часа, там активность каталазы варьировалась от 57 до 67 мкмоль $H_2O_2$ / мг белка мин и от 83 до 87 мкмоль $H_2O_2$ / мг белка мин соответственно. Гипотермия от 6 и более часов, привела к резкому сокращению активности каталазы, что может быть результатом повреждающего действия низких температур.

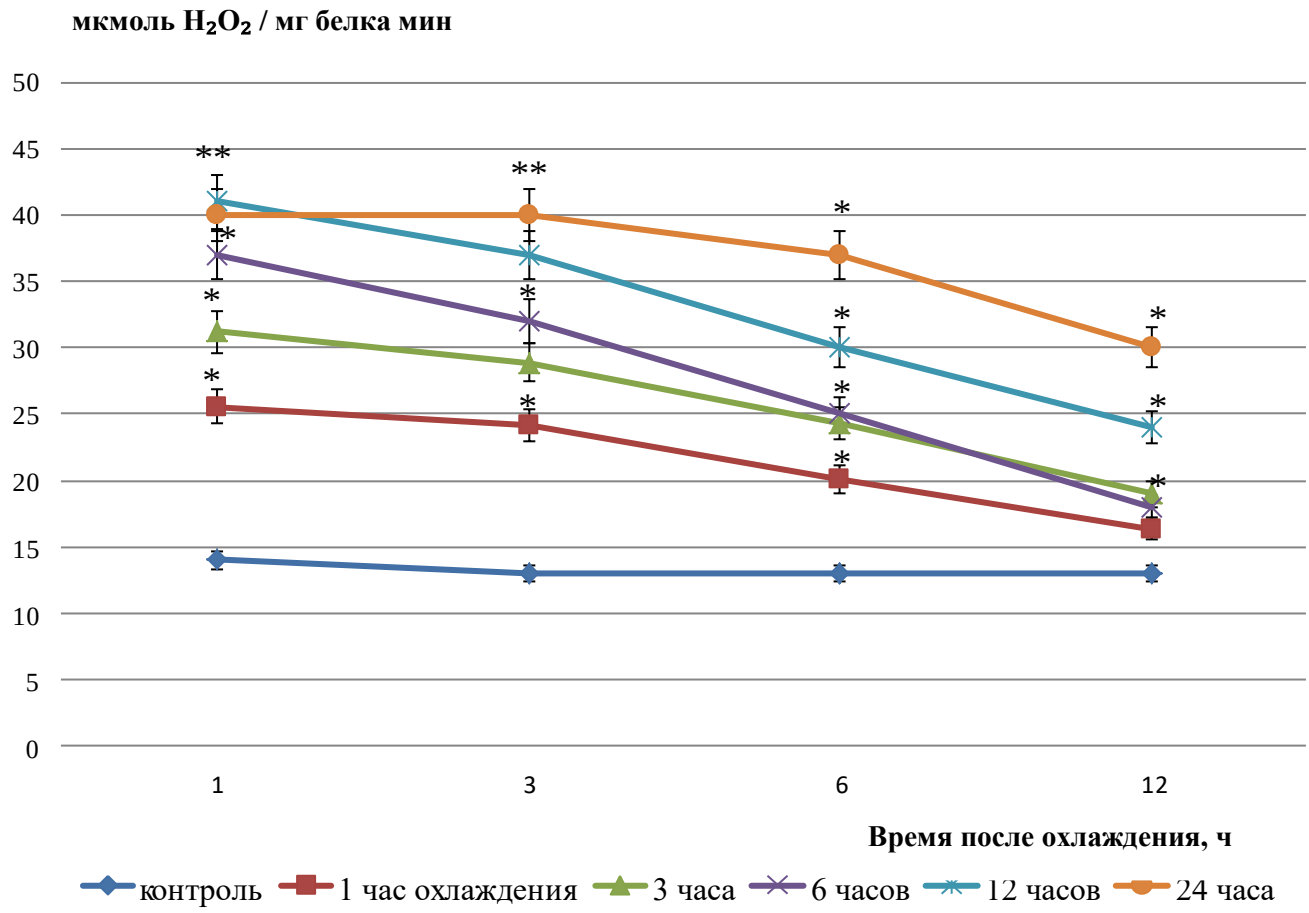



*Рисунок 27. Изменения активности каталазы в проростках гречихи после низкотемпературных воздействий(M±m, n=3; * - p < 0,05 относительно контроля).*

Активность каталазы после возвращения растений в исходные температурные условия (рис.27) начала снижаться уже спустя час, достигнув через 3 часа максимального значения в 40 $H_2O_2$ / мг белка мин у охлажденных в течении суток проростков. Через 12 часов адаптации, во всех пробах был отмечена минимальная активность каталазы, составляющая 18 $H_2O_2$ / мг белка мин у проростков с воздействием низких положительных температур до 6 часов, а 24 и 30 $H_2O_2$ / мг белка мин у проб, охлажденных 12 и 24 часа соответственно.

# ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стрессовое состояние растительного организма, являющееся результатом воздействия на него низких температур, вызывает в клетках и тканях комплекс реакций, упрощающий адаптацию к новым условиям среды обитания.

Из результатов проведенных исследований можно сделать вывод о действии низких положительных температур на биохимические и физиологические процессы растений гречихи.

Обработка семян температурой +4°С перед посевами способна изменить физиолого-биохимические параметры растения не только на момент воздействия, но и в дальнейших этапах онтогенеза. Характер полученных изменений может быть как неспецифическим, так и специфическим. К первым относится повышение концентрации пролина, которое приводит к образованию агрегатов, схожих по действию с гидрофильными коллоидами, которые задерживают в клетках воду. Помимо этого, неспецифическую ответную реакцию вызывает повышение активности пероксидазы и полифенолоксидазы, активация синтеза разнообразных стрессовых белков. Специфические реакции, вызванные краткосрочным воздействием щадящих низких положительных температур, способствуют закаливанию – развитию дальнейшей устойчивости растения к похолоданиям.

У проростков гречихи, подверженных воздействию холода, проявились механизмы адаптации к действию фактора стресса и защитные реакции, направленные на его устранение.

Течение стрессовых процессов в проростках изменяют не только активность некоторых ферментов, но и их ферментно-субстратные взаимодействия. Такой скачек ферментативной активности на ранних этапах развития приводит к ускорению гидролитических и обменных процессов.

Низкотемпературное воздействие на растение гречихи вызвало увеличение активности полифенолоксидазы и пероксидазы на 10% и 35% соответственно по сравнению с контролем.

К последствиям холодового шока относится снижение ростовых процессов, энергии прорастания, всхожести. Причина этого может быть в торможении роста на ранних этапах развития и уменьшении жизнеспособности проростков и семян гречихи при воздействии низких температур.

Экспериментальные данные этого исследования в дальнейшем помогут сформировать основу для дальнейшего применения в сельском хозяйстве, поскольку умеренное и грамотное воздействие холодом, способствует закаливанию растительного организма.

Полученные в ходе экспериментов данные позволили сформулировать следующие выводы:

1. Была отслежена динамика изменения активности каталазы в семенах и проростках гречихи в условиях низких положительных температур. Под влиянием низкотемпературного воздействия, активность каталазы повышалась как в проростках, так и в семенах, и снижалась, когда данное воздействие прекращалось.

2. Была отслежена динамика изменения содержания пролина в семенах и проростках растений гречихи в условиях низких положительных температур. Гипотермия повышает количество пролина в семенах и проростках, а период адаптации растения проходит при его сниженных показателях.

3. Была отслежена динамика изменения активности пероксидазы в семенах и проростках гречихи в условиях низких положительных температур. Низкие температуры вызывают у семян и проростков гречихи повышение активности фермента, которая во время адаптационного периода резко снижается.

4. Была отслежена динамика изменения активности полифенолоксидазы в семенах и листьях растений гречихи в условиях низких положительных температур. Эксперимент показал, что активность ПФО при гипотермии повышается как в семенах, так и в проростках гречихи, и падает после прекращения стрессорного воздействия.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ


1. Алехина Н.Д. Физиология растений: Учебник для студ. вузов / Н.Д. Алехина, Ю.В. Балнокин, В.Ф. Гавриленко, Т.В. Жигалова, Н.Р. Мейчик, А.М. Носов, О.Г. Полесская, Е.В. Харитонашвили, В.В. Чуб; Под ред. И.П. Ермакова. М.: Издательский центр «Академия», 2005. 640 с.
2. Аллагулова Ч.Р. Вклад дегидринов в антиоксидантную защиту растений / Ч.Р. Аллагулова, Ф.М. Шакирова // 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. 48 – 51.
3. Антипина О.В. Способность листьев и корней теплолюбивых растений табака к формированию устойчивости к гипотермии / Антипина Ольга Валерьевна: автореф. дис.канд.биол. наук: 03.01.05. Москва, 2010. 24 с.
4. Балагурова Н.И. Влияние локального охлаждения пропроростков огурца и пшеницы на различные виды устойчивости листа и корня / Н.И. Балагурова, Т.В. Акимова, А.Ф. Титов // Физиология растений. 2001. Т. 48. С. 113 – 118.
5. Войников В.К. Энергетическая и информационная системы растительных клеток при гипотермии / В.К. Войников // Новосибирск: Наука, 2013. 212 с.
6. Газарян И.Г. Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений / И.Г. Газарян, Д.М. Хушпульян, В.И. Тишков // Успехи биол. химии. 2006. Т. 46. С. 303 – 322.
7. Гарифзянов А.Р. Образование и физиологические реакции активных форм кислорода в клетках растений / А.Р. Гарифзянов, Н.Н. Жуков,

В.В. Иванищев // Современные проблемы науки и образования. 2011. № 2. С. 1 21.

8. Гармаш Е.В. Альтернативный путь дыхания в растениях: регуляция и функции / Е.В. Гармаш // Известия Коми научного центра УрО РАН. 2010. Вып. 3. С. 26 31.
9. Дроздов С.Н. Некоторые аспекты экологической физиологии растений / С.Н. Дроздов, В. К. Курец. Петрозаводск: ПетрГУ, 2003. 172 с.
10. Дроздов С.Н. Терморезистентность активно вегетирующих растений / С.Н. Дроздов, В.К. Курец, А.Ф. Титов. Л.: Наука, 1984. 168 с.
11. Загоскина Н.В. Активные формы кислорода и антиоксидантная система растений / Н.В. Загоскина, Л.В. Назаренко // Вестник Московского городского педагогического университета. Серия: Естественные науки. 2016. № 2 (22). С. 9 – 23.
12. Касперска-Палач А. Механизм закаливания травянистых растений / А. Касперска-Палач // Холодостойкость растений / Пер. с англ. Г.Н. Зверевой, М.М. Тюриной; Под ред. и с предисл. Г.А. Самыгина. М.: Колос, 1983. 318 с.
13. Климов С.В. Адаптация растений к стрессам через изменение донорноакцепторных отношений на разных уровнях структурной организации / С.В. Климов // Успехи современной биологии. 2008а. Т. 128 (3). С. 281 – 299.
14. Колупаев Ю.Е. Антиоксиданты растительной клетки, и их роль в АФК сигналинге и устойчивости растений / Ю.Е. Колупаев // Успехи соврем. биол. 2016. Т. 136. С. 181 – 198.
15. Колупаев Ю.Е. Механизмы адаптации растений к гипотермии: роль антиоксидантной системы / Ю.Е. Колупаев, Е.И. Горелова, Т.О. Ястреб // Вісник Харківського Національного Аграрного Університету. Серія Біологія. 2018. Вип.1 (43). С. 6 33.

16. Коровин А.И. Растения и экстремальные температуры / А.И. Коровин. Л.: Гидрометеоиздат, 1984. 271 с.
17. Креславский В. Д. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений / В.Д. Креславский, Д.А. Лось, С.И. Аллахвердиев, Вл.В. Кузнецов // Физиология растений. 2012. Т. 59 (2). С. 163 – 178.
18. Кузнецов Вл.В. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция / Вл.В. Кузнецов, Н.И. Шевякова // Физиология растений. 1999. Т. 46. С. 321 – 336.
19. Кузнецов Вл.В. Физиология растений в 2 т. Т. 1: учебник для академического бакалавриата / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Издательство Юрайт, 2016a. 437 с.
20. Кузнецов Вл.В. Физиология растений в 2 т. Т. 2: учебник для академического бакалавриата / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Издательство Юрайт, 2016b. 459 с.
21. Лось Д.А. Молекулярные механизмы холодоустойчивости растений / Д.А. Лось // Вестник РАН. 2005. Т. 75 (4). С. 338 – 345.
22. Лукаткин А.С. Оценка воздействия температурных стрессоров на растения кукурузы по изменению антиоксидантной активности / А.С. Лукаткин, Н.В. Нарайкина // Доклады Российской Академии сельскохозяйственных наук. 2011. Т. 5. С. 8 – 10.
23. Лукаткин А.С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс / А.С. Лукаткин. Саранск: Изд-во Мордовск. ун-та, 2002. 208 с
24. Лукаткин А.С. Вклад окислительного стресса в развитие холодового повреждения в листьях теплолюбивых растений. 1. Образование активированных форм кислорода при охлаждении растений // Физиология растений, 2002 а. Т.49. № 5. С.697 – 710.
25. Лукаткин А.С. Вклад окислительного стресса в развитие холодового повреждения в листьях теплолюбивых растений. 2.

Активность антиоксидантных ферментов в динамике охлаждения /А.С. Лукаткин // Физиология растений, 2002 б. Т.49. № 6. С.878 – 885.

26. Лукаткин А.С. Вклад окислительного стресса в развитие холодового повреждения в листьях теплолюбивых растений. 3. Повреждение клеточных мембран при охлаждении теплолюбивых растений /А.С. Лукаткин // Физиология растений, 2003. Т.50. № 2. С.271 – 274.
27. Лукаткин А.С. Инициация и развитие холодового повреждения в листьях теплолюбивых растений /А.С. Лукаткин // Физиология растений, 2005. Т.52. № 4. С.608 – 613.
28. Максимов И.В. Структурно-функциональные особенности изопероксидаз растений / И.В. Максимов, Е.А. Черепанова, Г.Ф. Бурханова, А.В. Сорокань, О.И. Кузьмина // Биохимия. 2011b. Т. 76 (6). С. 749 – 763.
29. Марковская Е.Ф. Кратковременная гипотермия и растение / Е.Ф. Марковская, М.И. Сысоева, Е.Г. Шерудило. Петрозаводск: Карельский науч. центр РАН, 2013. 194 с.
30. Медведев С.С. Биология развития растений. В 2-х т. Том 1. Начала биологии развития растений. Фитогормоны: Учебник / С.С. Медведев, Е.И. Шарова. СПб.: Издво С.-Петерб. Ун-та, 2011. 253 с.
31. Медведев С.С. Физиология растений: учебник / Медведев, С.С. СПб.: БХВПетербург, 2012. 512 с.
32. Мирошниченко О.С. Биогенез, физиологическая роль и свойства каталазы / О.С. Мирошниченко // Биополимеры и клетка. 1992. Т. 8. С. 2 – 25.
33. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода / О.Г. Полесская. М.: КДУ, 2007. 140 с.

34. Пятыгин С.С. Стресс у растений: физиологический подход / С.С. Пятыгин // Элементы. 2008. Т.69, № 4 С. 294 – 298
35. Рогожин В.В. Практикум по физиологии и биохимии растений: учеб. пособие / В.В. Рогожин, Т. В. Рогожина. СПб.: ГИОРД, 2013. 352 с.
36. Сошинкова Т.Н. Пролин и функционирование антиоксидантной системы растений и культивируемых клеток Thellungiella salsuginea при окислительном стрессе / Т.Н. Сошинкова, Н.Л. Радюкина, Д.В. Королькова, А.В. Носов // Физиология растений. 2013. Т. 60 (1). С. 47 – 60.
37. Тараканов Г.И. Овощеводство / Г.И. Тараканов, Д.В. Мухин, К.А Шуин и др. М.: Колос, 2003. 472 с.
38. Тарчевский И.А. Метаболизм растений при стрессе / И.А. Тарчевский. Казань: Фэн, 2001. 448 с.
39. Удовенко Г.В. Физиологические механизмы адаптации растений к различным экстремальным условиям / Г.В. Удовенко // Тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции. 1979. Т. 64 (3). С. 5 22.
40. Фесенко Н.В. Селекция и семеноводство гречихи./ Н.В. Фесенко - М. Колос, 1983. 190 с.
41. Фесенко Н.В., Фесенко, А.Н. О роли морфогенетических процессов в адаптации гречихи/ Н.В. Фесенко, А.Н. Фесенко // Аграрная Россия. 2002. № 1. С.64 – 67.
42. Хан А.А. Физиология и биохимия покоя и прорастания семян. / А.А. Хан- М.: Колос, 1982. 495 с.
43. Чупахина Г.Н. Природные антиоксиданты (экологический аспект): монография / Г.Н. Чупахина, П.В. Масленников, Л.Н. Скрыпник. Калининград: Изд-во БФУ им. И. Канта, 2011. 111 с.
44. Шарова Е.И. Антиоксиданты растений: учеб. пособие / Е.И. Шарова. СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2016. 140 с.

45. Aebi H. Catalase in vitro / H. Aebi // Methods in Enzymol. 1984. Vol. 105. P. 121 – 126.
46. Anjum N.A. Catalase and ascorbate peroxidase—representative H2O2-detoxifying heme enzymes in plants / N.A. Anjum, P. Sharma, S.S. Gill, M. Hasanuzzaman, E.A. Khan, K. Kachhap, A.A. Mohamed, P. Thangavel, G.D. Devi, P. Vasudhevan, A. Sofo, N.A. Khan, A.N. Misra, A.S. Lukatkin, H.P. Singh, E. Pereira, N. Tuteja // Environ. Sci. Pollut. Res. 2016. Vol. 23. P. 19002 – 19029.
47. Apel K. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction / K. Apel, H. Hirt // Annu. Rev. Plant Biol. 2004. Vol. 55. P. 373 – 399.
48. Asada K. The water water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons / K. Asada // Annu. Rev. Plant Biol. 1999. Vol. 50 (1). P. 601 – 639.
49. Asadi-Sanam S. The physiological and biochemical responses of eastern purple coneflower to freezing stress / S. Asadi-Sanam, H. Pirdashti, A. Hashempour, M. Zavareh, G.A. Nematzadeh, Y. Yaghoubian // Rus. J. Plant Physiol. 2015. Vol. 62. P. 515 – 523.
50. Banzet N. Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cell / N. Banzet, C. Richand, Y. Deveaux, M. Kazmaier, J. Gagnon, C. Triantaphylides // Plant J. 1998. Vol. 13. P. 519 – 527.
51. Bates L.S. Rapid determination of free proline for water stress studies / L.S. Bates, R.P. Waldeen, I.D. Teare / Plant Soil. 1973. 39 (1). P. 205 – 207.
52. Bhattacharjee S. Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plants / S. Bhattacharjee // Curr. Sci. 2005. Vol. 89 (7). P. 1113 – 1121.

53. Blokhina O. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review / O. Blokhina, E. Virolainen, K.V. Fagerstedt // Ann. Bot. 2003. Vol. 91. P. 179 – 194.
54. Cao Y.-Y. Exogenous sucrose increases chilling tolerance in cucumber seedlings by modulating antioxidant enzyme activity and regulating proline and soluble sugar contents / Y.- Y. Cao, M.-T. Yang, X. Li, Z.-Q. Zhou, X.-J. Wang, J.-G. Bai // Sci. Horti. 2014. Vol. 179. P. 67 – 77.
55. Cui C. Effects of chilling stress on membrane lipid peroxidation and antioxidant system of Nicotiana tabacum L. seedling / C. Cui, Q.Y. Zhou, C.B. Zhang, L.J. Wang, Z.F. Tan // Afr. J. Agric. Res. 2013. Vol. 8 (47). P. 6079 – 6085.
56. Demidchik V. Reactive oxygen species, oxidative stress and plant ion channels / V. Demidchik. In. Ion Channels and Plant Stress Responses. V. Demidchik, Fr. Maathuis (Eds). Berlin, Heidelberg, Springer, 2015. P. 207 – 232.
57. Feng Z. Amelioration of chilling stress by triadimefon in cucumber seedlings / Z. Feng, A. Guo, Z. Feng // Plant Growth Regul. 2003. Vol. 39. P. 277 – 283.
58. Foyer C.H. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a reevaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context / C.H. Foyer, G. Noctor // Plant Cell Environ. 2005. Vol. 29. P 1056 – 1071.
59. Gill S.S. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants / S.S. Gill, N. Tuteja // Plant Physiol. Biochem. 2010. Vol. 48. P. 909 – 930.
60. Kuk Y.I. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants / Y.I. Kuk, J.S. Shin, N.R. Burgos, T.E. Hwang, O. Han, B.H. Cho, S. Jung, J.O. Guh // Crop Sci. 2003. Vol. 43 (6). P. 2109 – 2117.
61. Maehly A.C. The assay of catalase and peroxidase / A.C. Maehly, B. Chance // Meth. Biochem. Anal. 1954. Vol. 1. P. 357 – 424.

62. Minibayeva F. Wound-induced apoplastic peroxidase activities: their roles in the production and detoxification of reactive oxygen species / F. Minibayeva, O. Kolesnikov, A. Chasov // Plant Cell Environ. 2009. Vol. 32. P. 497 – 508.
63. Navrot N. Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses / N. Navrot, V. Collin, J. Gualberto, E. Gelhaye, M. Hirasawa, P. Rey, D.B. Knaff, E. Issakidis, J.P. Jacquot, N. Rouhier // Plant Physiol. 2006. Vol. 142 (4). P. 1364 – 1379.
64. Willekens H. Catalase is a sink for H2O2 and is indispensable for stress defense in C3 plants / H. Willekens // EMBO J. 1997. Vol. 16. P. 4806 – 4816.