

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

Профили подготовки Биохимия

Форма обучения очная

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

на тему:

**«ДЕЙСТВИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА НА РОСТ, РАЗ-
ВИТИЕ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ПРО-
РОСТКОВ ПШЕНИЦЫ»**

Студент



Терёхина Яна Владимировна

Руководитель



Солдатов С.А.

Нормоконтролер



Клыченков С.В.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 19.06.23 № 4)

Заведующий кафедрой



Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой

принято

(протокол заседания ГЭК от 04.07.23 № 9)

Секретарь ГЭК



Клыченков С.В.

Пенза, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1. Понятие устойчивости и стресса. Особенности развития стресс – реакции у растений	7
1.2. Действие низкотемпературного стресса.....	13
1.3. Действие низкотемпературного стресса на рост и развитие проростков пшеницы	22
1.4. Действие низкотемпературного стресса на физиолого-биохимические процессы проростков пшеницы	24
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	29
ГЛАВА 3. ДЕЙСТВИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА НА РОСТ, РАЗВИТИЕ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ	41
3.1. Влияние низкотемпературного стресса на содержание пролина у проростков пшеницы	41
3.2. Влияние низкотемпературного стресса на активность пероксидаз у проростков пшеницы	43
3.3. Влияние низкотемпературного стресса на активность полифенолоксидазы у проростков пшеницы	45
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	48
ЛИТЕРАТУРА	53

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Изучение адаптивных возможностей растений и их устойчивости к неблагоприятным воздействиям окружающей среды относится к центральным проблемам биохимии и физиологии растений. Особенно актуальными в данном направлении остаются исследования, направленные на установление механизмов адаптации растительных объектов к низким температурам. Прежде всего, это связано с тем, что низкотемпературный стресс и вызываемые им повреждения являются одними из основных факторов, ограничивающими рост, урожайность и распространение растений на земном шаре.

Во многих случаях повышение морозоустойчивости культурных растений всего на 2-3°C может обеспечить получение хорошего урожая там, где они пока не выращиваются из-за низкой температуры. Известно, что в нашей стране большинство пахотных земель находятся в так называемых «зонах рискованного земледелия», где неблагоприятные температурные условия возникают часто, либо постоянно. Таким образом, исследование механизмов адаптации растений к низкотемпературному воздействию имеет не только важное теоретическое, но и огромное практическое значение, поскольку дает возможность определения путей для создания приемов, повышающих холодоустойчивость ценных сельскохозяйственных культур.

В глобальном масштабе наблюдается устойчивый рост спроса на продовольственные товары, что приводит к необходимости интенсификации растениеводства. В условиях, которые усугубляются глобальным изменением климата, использование математического моделирования может быть эффективным инструментом для решения вопросов оптимизации системы землепользования. В то же время диапазон и масштаб моделируемых процессов чрезвычайно огромен: от глобальной экологии до прогнозирования динамики отдельных компонентов агроценозов.

Изменение климата является одной из основных проблем последнего

времени, поскольку оно угрожает глобальной продовольственной безопасности. Неопределенные климатические колебания создают серьезную проблему для удовлетворения будущих потребностей растущего населения в продуктах питания. Экстремальные температурные явления значительно участились за последние несколько десятилетий. В сельскохозяйственных регионах по всему миру наблюдались устойчивые экстремальные холода с различной частотой, интенсивностью и продолжительностью. Эта ситуация останавливает рост растений, вызывая механические повреждения и метаболическую дисфункцию из-за кристаллизации льда. Большинство районов выращивания пшеницы в мире часто подвергаются низкотемпературному стрессу, например, Китай, Соединенные Штаты, Европа и Австралия. Несмотря на то, что в некоторых регионах из-за глобального потепления продолжительность зимы сократилась, экологи выявили парадоксальную связь между ростом растений и климатическими изменениями, подтверждая, что резкий рост в теплом климате увеличивает риск повреждения растений холодом.

Непредсказуемая изменчивость температуры связана с частыми экстремально низкими температурами. Пшеница является ведущей культурой в удовлетворении глобальных потребностей в продуктах питания. Экстремальные температуры, обусловленные климатом, влияют на вегетативный и репродуктивный рост пшеницы, что приводит к снижению урожайности. В этом обзоре описывается, как низкая температура вызывает ряд изменений в морфофизиологическом, биохимическом и молекулярном составе пшеницы и как это воспринимается. Чтобы справиться с этими изменениями, культурные растения включают свои механизмы устойчивости к холоду, характеризующиеся накоплением растворимых углеводов, сигнальных молекул и экспрессией генов устойчивости к холоду.

Каждый год 85% посевных площадей пшеницы в мире страдают от весенних заморозков, и обычно это происходит в марте и апреле на ранней стадии всходов. В весенний сезон, когда температура полога пшеницы падает на 0°C или ниже, происходит сильное повреждение морозом; частые периоды

низких температур весной вызывают серьезные повреждения микроорганелл клетки, что приводит к избытку активных форм кислорода (АФК) и возникновению перекисного окисления липидов. Короткий промежуток морозного воздуха во время морозного стресса губителен для вегетативного и репродуктивного роста растений. Холодные условия нарушают поглощение воды корнями, а недостаток воды в стебле приводит к стрессу от засухи. Это состояние засухи из-за несбалансированного водного баланса вызывает нарушение равномерного поглощения питательных веществ, снижает скорость поглощения ионов корнями и ограничивает перенос питательных веществ к другим частям растения, что в конечном итоге приводит к задержке роста растений. В системе взаимодействия «организм-среда» период осенней вегетации растений озимой пшеницы является одним из важнейших подготовительных этапов, отвечающих за реализацию их биологического потенциала. Состояние озимых культур после завершения осенней вегетации имеет решающее значение для их перезимовки. Одним из основных процессов, который предопределяет будущий урожай озимой пшеницы, является закаливание к неблагоприятным метеорологическим условиям зимнего периода.

Цель и задачи исследований. Целью бакалаврской работы являлось изучение действия низкотемпературного стресса на рост, развитие и физиолого-биохимические процессы проростков пшеницы.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

- исследовать понятие устойчивости и стресса, особенности развития стресс – реакции у растений;
- охарактеризовать действие низкотемпературного стресса;
- выявить действие низкотемпературного стресса на рост и развитие проростков пшеницы;
- проследить действием низкотемпературного стресса на физиолого-биохимические процессы проростков пшеницы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Понятие устойчивости и стресса. Особенности развития стресс – реакции у растений

Термин «стресс», который обозначает напряжение и происходит из английского языка, изначально использовался в медицине. Ганс Селье, ученый, сформулировавший основы теории стресса, стал применять этот термин для описания промежуточного состояния растений [34]. На урожайность сельскохозяйственных культур в основном влияют климатические факторы, агрономические факторы, вредители и доступность питательных веществ в почве. Стресс – это любое неблагоприятное состояние окружающей среды, которое препятствует правильному росту растения. Абиотический стресс оказывает неблагоприятное воздействие на многочисленные процессы морфологии, биохимии и физиологии, которые непосредственно связаны с ростом и урожайностью растений.

Абиотический стресс является количественным признаком, следовательно, гены, связанные с этими признаками, могут быть идентифицированы и использованы для отбора желательных аллелей, ответственных за толерантность растений. Растения могут инициировать ряд молекулярных, клеточных и физиологических модификаций, реагируя на абиотический стресс и адаптируясь к нему. Засуха, засоление и холод существенно влияют на урожайность сельскохозяйственных культур. Абиотический стресс снижает доступность воды для корней растений, увеличивая содержание водорастворимых солей в почве, и растения страдают от повышенного осмотического давления вне корня. Физиологические изменения включают снижение осмотического потенциала листьев, водного потенциала и относительного содержания воды, создание дисбаланса питания, усиление относительного стрессового повреждения или одно или более сочетаний этих факторов.

Морфологические и биохимические изменения включают изменения в

длине корней и побегов, количестве листьев, накоплении вторичных метаболитов (глицинбетаин, пролин, МДА, абсцизовая кислота) в растении, соотношении источников и поглотителей.

Растения в их физической среде подвержены нескольким типам изменений. Животные используют методы для предотвращения последствий этого изменения, но растения терпят неудачу из-за сидячего характера привычки роста. Таким образом, растения полагаются на свои внутренние процессы, чтобы пережить изменения во внешней среде. Растения вынуждены функционировать в колеблющейся среде, и нормальным внешним изменениям противостоят внутренние изменения без какого-либо ущерба для роста или развития. Возможность абиотического стресса или стресса окружающей среды заключается в причинении физического вреда растению из-за серьезных или хронических неблагоприятных условий окружающей среды. Любое неблагоприятное воздействие неживых факторов на живые существа в фиксированных условиях описывается как абиотический стресс.

Чтобы существенно повлиять на демографический результат организма или индивидуальную физиологию, неживой фактор должен изменять окружающую среду за пределами своего обычного диапазона вариаций. Из-за продолжающегося изменения климата и ухудшения состояния окружающей среды, вызванного деятельностью человека, физический окружающий стресс стал ключевой угрозой продовольственной безопасности. Стресс от нехватки воды, солевой стресс, дисбаланс в питательных веществах (включая токсичность и дефицит минералов) и экстремальные температуры являются значительными экологическими ограничениями на продуктивность сельскохозяйственных культур во всем мире [1].

На рост растений и урожайность в основном влияют холод, засуха, соль и тяжелые металлы. Абиотический стресс воздействует на растения на молекулярном уровне, начиная с морфологических уровней, и проявляется на всех фазах развития растений, где возникает засуха [12]. Существует три важные стадии растения: вегетативное развитие, период до цветения и тер-

минальная фаза, на которые влияет засуха [15]. Физиологические реакции растений на стресс включают увядание листьев, опадение листьев, уменьшение площади листьев и снижение потерь воды в результате транспирации [14].

В условиях засушливого стресса развитие сельскохозяйственных культур в значительной степени облегчает проблему чрезмерного использования воды в сельском хозяйстве. Снижается тургор, который является одним из самых тонких физиологических механизмов, вызывающих рост клеток. Стресс от засухи приводит к нарушению потока воды у высших растений от ксилемы к соседним удлиняющимся клеткам, тем самым подавляя удлинение клеток. Кроме того, уменьшение площади листьев, высоты растений и развития урожая является результатом засухи из-за удлинения клеток, нарушения митоза и экспансии [9]. Устойчивость к абиотическому стрессу включает механизмы избегания побега и толерантности. Вредное воздействие стресса может быть уменьшено путем осмотической модификации, которая способствует активному накоплению растворенных веществ в цитоплазме для поддержания водного баланса клетки [4].

Во время первой фазы стресса:

1. Увеличивается проницаемость мембран в результате изменения молекулярного состава их компонентов.
2. Тормозятся процессы репликации, транскрипции и синтеза белка, изменяется конформация белковых молекул.
3. Снижается интенсивность фотосинтеза вследствие изменений структуры белков и липидов тилакоидных мембран.
4. Активируются свободнорадикальные процессы и синтез протекторных низкомолекулярных соединений.
5. Накапливаются продукты распада, роль которых многообразна.
6. Происходят сдвиги в гормональном балансе в сторону возрастания интенсивности синтеза ингибиторов роста (этилена, абсцизовой и жасмоновой кислот) и уменьшения количества гормонов – стимуляторов (ауксина,

цитокинина, гиббереллинов). Это ведет к торможению роста всего растения.

Во второй фазе стресса (фазе адаптации) у растений включаются главные механизмы адаптации, – снижение интенсивности процессов распада и усиление процессов синтеза.

В период третьей фазы (фазы истощения) в условиях возрастания силы воздействия и постепенного истощения возможностей защиты организма происходят необратимые повреждения клетки, связанные с разрушением клеточных структур.

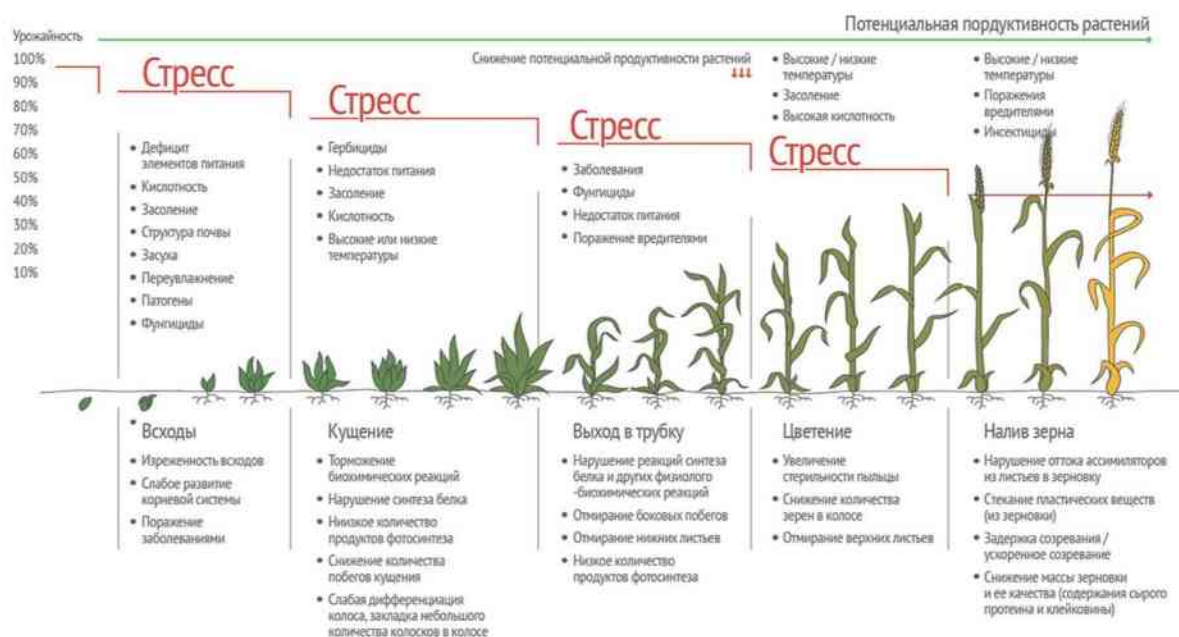


Рисунок 1. Взаимосвязь стресса и урожайности сельскохозяйственных растений

На выживание и географическое распространение растений также сильно влияют низкие температуры. Значительная потеря урожая из-за снижения роста растений и урожайности обычно вызвана холодовым стрессом [5]. Обезвоживание клеток и тканей и кристаллизация воды в клетках вызваны холодовым стрессом, тем самым снижая рост растений и продуктивность. Снижается проводимость мембран, повышается вязкость воды и тор-

мозится гидроактивное закрытие устьиц, что приводит к водному стрессу и повышенной утечке электролитов при низких температурах [6]. Это также замедляет метаболизм, рассеивает энергию и вызывает образование свободных радикалов в результате окислительного стресса [11].

Например, до 45% сельскохозяйственных угодий в мире приходится на частые периоды времени, когда выпадает мало осадков, на которых проживает 38% населения мира, а на площади более 3106 км, или около 6% всей площади суши, на карте мира наблюдается засоление [21]. Кроме того, 19,5% орошаемых сельскохозяйственных земель классифицируются как засоленные. Кроме того, около 1% сельскохозяйственных угодий в мире ежегодно ухудшается из-за засоления (2 млн. га), что приводит к снижению продуктивности сельскохозяйственных культур или вообще к их отсутствию [19]. Основной абиотический стресс, влияющий на растения во время их роста и развития, возникает из-за нехватки воды, вызванной недостаточным количеством осадков, холодными условиями и засолением. Согласно докладу ФАО о мировых почвенных ресурсах за 2000 год, площадь суши в мире, пострадавшая от засухи, холода и засоления, составляет 64, 57 и 6% соответственно. Понимание реакций культурных растений на абиотический стресс, таким образом, стало компонентом исследований растений для защиты продовольственной безопасности [8].

Эти абиотические стрессы характеризуют основную причину фиаско в посевах во всем мире, принося более 50% средней отдачи от значительных культур [14]. Поэтому улучшение культивирования жизненно важно для заполнения разрыва между ростом населения и производством продуктов питания, который увеличивается за счет повышения стрессоустойчивости. Растения могут вносить некоторые молекулярные, клеточные и физиологические модификации, чтобы реагировать на такие стрессы и акклиматизироваться к ним, чтобы справиться с абиотическим стрессом. Лучшее знание чувствительности растений к абиотическому стрессу, как в традиционном, так и в современном селекционном применении поможет повысить стрессо-

устойчивость. Исследования с высокой стрессоустойчивостью некоторых видов диких растений также вносят значительный вклад в наше понимание стрессоустойчивости.

Экстремальные температуры являются одной из основных причин различных абиотических стрессов, таких как засуха. Повышение или понижение температуры нежелательно влияют на рост, развитие и урожайность растений. Холодный стресс возникает, когда растения подвергаются воздействию очень низких температур. Стресс от холода является одним из основных абиотических стрессов, которые снижают продуктивность сельскохозяйственных культур, влияя на качество и продолжительность жизни после сбора урожая. Холодный стресс влияет на все характеристики клеточных функций в сельскохозяйственных культурах. Растения подразделяются на три вида в зависимости от реакции на низкие температуры: чувствительные к охлаждению растения, которые сильно повреждаются температурами выше 0°C и ниже 15°C; устойчивые к охлаждению растения, способные переносить низкие температуры и травмируемые, когда в тканях начинается образование льда; морозостойкие растения, способные переносить воздействие очень низких температур. Холодный стресс вызывает повреждение растений из-за изменений в структуре мембраны и уменьшения протоплазматического потока, утечки электролитов и плазмолиза, что приводит к повреждению клеток. Метаболизм клеток нарушается из-за увеличения или уменьшения частоты дыхания, и в зависимости от интенсивности стресса из-за аномального анаэробного дыхания происходит синтез аномальных метаболитов. Из-за повреждения клеток и измененного метаболизма происходит замедление роста растений, ненормальное созревание плодов, внутреннее изменение цвета (потемнение сосудов) и повышенная восприимчивость к гниению, что также приводит к гибели растения [15].

Если посевы подвергаются воздействию очень высоких температур, возникает тепловой стресс. В течение достаточного времени, чтобы нанести непоправимый вред функционированию или развитию растения. Тепловой

стресс определяется как повышенные температуры. Высокие температуры повышают скорость полового развития, что сокращает время, необходимое для добавления фотосинтеза к производству плодов или семян. Кроме того, высокие температуры могут вызывать стресс от засухи из-за повышенной потери воды в результате транспирации или испарения. Высокие температуры почвы могут снизить всхожесть растений. Стресс от высокой температуры может влиять на прорастание семян, рост и развитие растений, а также может вызвать необратимый стресс от засухи, который также может привести к гибели [16].

Засуха влияет на многие стадии развития растений. Засуха оказывает влияние на три основных периода развития растений – вегетационный, до появления пыльцы и терминальную стадию. Физиологические реакции растений на засуху включают увядание листьев, уменьшение их площади, опадение листьев и, таким образом, уменьшение потерь воды в результате транспирации. В различных агроэкологических условиях его обычно культивируют. Последствия засухи варьируются от морфологических до молекулярных. Засуха влияет на многие стадии развития растений. Засуха оказывает влияние на три основных периода развития растений – вегетационный, до появления пыльцы и терминальную стадию. Физиологические реакции растений на засуху включают увядание листьев, уменьшение их площади, опадение листьев и, таким образом, уменьшение потерь воды в результате транспирации. Удлинение клеток высших растений подавляется при серьезном дефиците воды из-за прерывания потока воды из ксилемы в соседние клетки, способствующие удлинению. Удлинение клеток, нарушение митоза и экспансии приводят в условиях засухи к снижению высоты растения, площади листьев и развития культуры. Существует постоянная потеря воды, приводящая к закрытию устьиц и нарушению клеточной структуры, а также метаболизма растений [13].

Вывод. Абиотические стрессы взаимосвязаны и влияют на соотношение воды в растениях на клеточном, а также на уровне всего растения, влияя

на определенные и неопределенные реакции, приводящие к ряду морфологических, физиологических, биохимических и молекулярных изменений, которые отрицательно влияют на рост и развитие растений.

1.2. Действие низкотемпературного стресса

Учитывая, что территория РФ частично находится в USDA 5 и USDA 6 климатических зонах (по системе USDA, разработанной Министерством сельского хозяйства США) [11], создание и выведение морозостойких сортов культурных растений, используемых для производства и создания запасов пищевой продукции, имеющих большое научное и хозяйственное значение. На сегодняшний день актуальным остается вопрос генетической детерминации устойчивости отдельных видов растений к воздействию низких температур, роли и механизмов адаптации растений к морозам.

В современное время устойчивость растений к низким температурам можно условно разделить на два вида: холодостойкость и морозоустойчивость. Холодостойкость – способность, которая проявляется в основном у теплолюбивых растений и позволяет им переносить низкие положительные температуры. Морозоустойчивость же определяется способностью переносить уже отрицательные температуры. И хотя в обоих случаях действуют схожие адаптационные механизмы, частично они отличаются [20]. В первую очередь стоит поговорить о холодостойкости. Почти все теплолюбивые растения страдают при снижении температуры, даже если эта температура остается положительной. Это можно заметить по проявлению внешних симптомов: появлению некротических пятен, увяданию побегов и листьев, замедленному времени вегетации. Первостепенный эффект низких положительных температур связан с появлением температурного стресса. Классификация сельскохозяйственных растений по холодостойкости рассмотрена на рисунке 2.



Рисунок 2. Классификация сельскохозяйственных растений по холодостойкости

В первую очередь происходит повреждение клеточных мембран, вследствие чего увеличивается их проницаемость. Нарушается гомеостаз ионов, большое количество ионов калия и кальция уходят из цитоплазмы в межклеточное пространство. Из-за нарушения целостности мембраны начинает меняться ее архитектура, происходят конформационные изменения липидов и белков. Нарушение состояния клеточной мембраны влечет за собой и нарушение работы мембран клеточных органелл, в частности хлоропластов и митохондрий.

Исследования, проведенные рядом ученых, свидетельствуют о сложности протекания адаптации растений к низким температурам. На сегодняшний день определена роль воды в закаливании растений, выявлены структурно-функциональные изменения клеток растений, в том числе перестройки плазматических мембран, охарактеризована роль полиаминов и фитогормонов в процессе приобретения растениями морозостойкости [12]. Понятно, что кроме перечисленных биологически активных веществ отдельная роль отводит-

ся воде, что составляет до 90% массы клетки. Воздействие холодового стресса сельскохозяйственных растений рассмотрено на рисунке 3.



Рисунок 3. Холодовой стресс сельскохозяйственных растений

Установлено, что у не закаленных растений при росте внеклеточного льда за счет дегидратации клетки, когда охлаждение достигает $-1...-2^{\circ}\text{C}$, протопласт сжимается в объеме на 50%, чего достаточно для гибели растительной клетки [3]. Выявлена связь между содержанием катионов магния в РНК и морозостойкости озимой мягкой пшеницы [4], а также влияние повреждения садовых растений вредителями и болезнями на способность выдерживать минусовые температуры [5]. Исследование Д.А. Сакович установили, что устойчивость древесных растений к низким температурам в условиях Северного Причерноморья зависит прежде всего от скорости перехода температурного диапазона через нулевую отметку. Наибольший интерес в последние годы представляют исследования механизмов морозостойкости зерновых, в частности тритикале [7], рапса [8], семьи Розовых, Виноградовых, поскольку их производительность определяет расцвет сельского хозяйства территориально европейских стран, включая РФ.

Термин «морозостойкость» у большинства литературных источников определяется, как индивидуально развитая способность растений противостоять минусовым температурам. Образование льда в клетках морозостойких растений происходит при более низких температурах по сравнению с неустойчивыми видами благодаря ряду физиолого-биохимических механизмов и сопровождается меньшими повреждениями. По мнению Ярчука И.И., ученые М.М. Макрушин, В.И. Кефели и А.Д. Сидоренко придают более корректное определение данному понятию, поскольку они учитывают генетическую обусловленность устойчивости [13].

Процессы адаптации растения к холоду и морозам основываются в первую очередь на снижении температуры окружающей среды, торможении интенсивности метаболических процессов, а также морфологических процессах, как повышение вязкоэластических свойств оболочки клеток, приближение дифференцированных клеток к апексу корня и изменения формы и объема клеток. Процесс закаливания – сложный биоконкомплекс, включающий ряд последовательных фаз [2]. Традиционно по Туманову выделяют две следующие фазы: в первой фазе закаливания снижается концентрация ауксинов, повышается проницаемость мембраны для воды, которая частично мигрирует в межклеточники; вторая же фаза характеризуется ростом концентрации сахаров и торможением роста растений [14]. Впрочем, на базе накопленных фактов и многолетних опытов А.И. Колоша предполагает уже шесть фаз прохождения процесса закаливания, однако принципиальных противоречий между обеими теориями нет, только теория Колоши предстает в виде более развернутой традиционной теории Туманова [15].

Развитие морозостойкости в первой фазе закаливания по Туманову лучше протекает при наличии света, когда клетка способна накопить больше энергетических веществ за счет фотосинтеза, повысить синтез белков и запастись резервными липидами, локализуемыми вдоль клеточных стенок. Световое облучение с преобладанием маленьких волн провоцирует синтез свободных аминов и белков в клеточках. Растения, облученные таким светом, развива-

ются медленно и зимой отличаются высокой морозостойкостью. При отсутствии облучения во второй фазе закаливания при $-3...-7^{\circ}\text{C}$, морозостойкость снижается на 30% и более. Закаленные во второй фазе растения достаточно хорошо переносят температуру -10°C , за исключением сорта ячменя Ченад-345. Вместе с тем растения зимостойкого роста озимого ячменя Паладиум 14/14 быстрее входят во вторую фазу закаливания и хорошо выживают при температурах порядка $-8...-10^{\circ}\text{C}$ [2]. Для достижения истинного анабиоза после второй фазы требуется быстрое охлаждение при температурах от -78 до -196°C [16].

В реализации разных фаз закаливания огромную роль играет вода. Известно, что в тканях растений вода локализована во внутриклеточном и внеклеточном пространстве, причем внутриклеточная вода может находиться в трех состояниях: свободном, связанном и крепко связанном [17]. Одним из первых изменений, происходящих в начальный период закаливания растений, является уменьшение свободной воды в клетках узлов кушения. Так, в клетках не закаленной пшеницы содержится до 6 г воды, а после закаливания – 2 г. Это связано с миграцией воды в межклеточники, а в цитоплазме накапливаются водорастворимые белки. Обезвоживание растительных клеток является следствием разности химического потенциала молекул воды, переохлажденных внутри клеток, и локализованных молекул в кристаллах внешнего льда.

В случае внутриклеточного замерзания клетки не будут разрушаться, если процессы кристаллизации и отогрева будут происходить очень быстро ($1000^{\circ}\text{C}/\text{мин}$). Понятно, что достичь подобного эффекта в естественных условиях невозможно, поэтому с целью предотвращения необратимых повреждений, морфологически проявляющихся в мембранных и протоплазматических структурах, потемнение ядер клеток и фростплазмолиза, следует снизить вероятность возникновения внутриклеточных кристаллов льда и значение криоскопической точки замерзания «внутренней» воды. Решение проблемы губительной внутриклеточной кристаллизации заключается в медлен-

ном охлаждении со скоростью не более 0,5-1°C/мин, не ведущей к формированию внутриклеточных кристаллов льда [12].

Характерно то, что холодостойкие растения обычно имеют более простую морфологию и их меристемные ткани лучше защищены по сравнению с теплолюбивыми растениями. Морозостойкие растения способны быстро переориентировать свой метаболизм в ответ на влияние низкой температуры путем синтеза специфических стресс-белков и резервных веществ. Такими веществами, тормозящими кинетику замерзания, то есть выступающими в роли криопротекторов, являются некоторые молекулы гемицеллюлоз (крыланы, арабиноксиланы), выделяемые цитоплазмой в клеточную стенку. Механизм их действия состоит в поддержании сосудистой воды в переходном состоянии и в обволакивании растущих кристаллов, предупреждая их рост [18].

При отрицательных температурах скорость всех биохимических процессов в клетках замедляется, а некоторые из них полностью угнетаются. Так, при торможении активности каталаз их функциональное воздействие компенсируется активизацией альтернативных механизмов, например, повышенной активностью пероксидаз [19].

В результате уменьшения размера клеток под влиянием холодовой дегидратации повышается вязкость цитоплазмы и мембран, снижается их потенциал и pH, рост растения замедляется в результате пропорционального увеличения длительности всех фаз митотического цикла. Последнее явление происходит вследствие изменения метаболизма фенольных соединений в сторону синтеза лигнина, что повышает вязкоэластические свойства внешней оболочки, то есть повышает ее механическую стойкость [21]. Общее содержание фенольных соединений у морозостойких растений очень низкое, за исключением β -оксибензойной кислоты, выступающей в качестве кофактора оксидазы индолилуксусной кислоты (ИОК), ликвидирующей влияние индолил-3-уксусной кислоты – сильного ростового фактора группы ауксинов [18]. Перестройки плазматических мембран в условиях адаптации растительных

организмов к холоду на сегодня изучены недостаточно. В неустойчивых к морозам растениях повреждение мембран состоит в том, что содержание фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина снижается, концентрация фосфатидной кислоты увеличивается, что связано с активацией внутримембранных фосфолипаз в период замораживания растительного объекта. Активность таких фосфолипаз регулируется концентрацией ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} , причем последний выступает, в противоположность первому, в качестве ингибитора. В результате изменения проницаемости мембран при охлаждении накопления ионов Ca^{2+} способствует активации фосфолипазы D и разрушению липидных матриц. Кроме того, у незакаленных растений могут повреждаться белки цитоскелета [2].

Роль цитоскелета в устойчивости растений к экстремальным факторам среды отражена в работах ученых Хохловой Л.П. и Макаровой М.В. [22], Абдуллаевой Т.М. и Магомедовой М.А. [23].

Также выдвинуто предположение, что абсцизовая кислота, равно как и закаливание, запускает процессы холодовой адаптации через деструкцию цитоскелета и изменение поступления ионов кальция в цитоплазму [22]. Существенную роль в поддержании жизнеспособности растительных клеток в условиях понижения температуры играют полиамины (путресцин, спермидин, спермин), концентрация которых при процессе охлаждения возрастает. Указанные полиамины формируют ионные связи с отрицательно заряженными группами различных биополимеров и тем самым стабилизируют макромолекулярные структуры клеток – мембран, нативных ДНК, рибосом. Известно, что, например, в листьях овса при действии осмотического шока содержание диаминов растет в 40 раз. Следовательно, полиамины выступают в процессе адаптации к пониженным температурам как своеобразные криопротекторы [2]. Криопротекторными свойствами обладают также и углеводы. Для морозостойкости имеют значение низкомолекулярные сахара, содержащиеся в цитоплазме, а не в вакуолях. Защитная роль сахара в отношении белков обратно пропорциональна их молекулярной массе [24]. В первой фазе

происходит накопление глюкозы, фруктозы, занозы, мальтозы, рамнозы и лактозы в узлах кушения при температурах близких к 0°C.

Во время второй фазы в результате повышения гидролитической активности ферментов углеводного обмена – мальтозы и инвертазы – мальтоза разлагается на два вида глюкозы, рафиноза – на фруктозу и глюкозу.

Учитывая большое количество научной информации по природе механизма морозостойкости, их разрозненность и разнообразие можно сделать вывод, что процесс адаптации растительных организмов к стрессовому фактору в виде низких температур невероятно сложен и многокомпонентен.

Начальным сигналом для входа растения в состояние покоя является снижение температуры окружающей среды и сокращение фотопериода. Эти абиотические факторы ингибируют активные гены, контролирующие рост, развитие и фотосинтез, определяют формирование метаболических путей адаптации и активируют экспрессию генов контроля холодостойкости клетки. Это влечет синтез стресс-белков, адаптогенов и стресс-протекторов (сахара, полиамины и т.п.). Совокупное действие всех перечисленных факторов, включая перестройку цитоскелета клетки, изменения функционирования системы ферментов и фитогормонов направлены на снижение криоскопической точки замедзания воды и предотвращение формирования крупно дисперсных кристаллов льда внутри клетки. Выяснение механизмов изменения экспрессии генома в ответ на низкотемпературное воздействие и структурные и биохимические перестройки плазматических мембран могут стать фундаментальным открытием адаптации растений к окружающей среде.

Холодный стресс – это значительный абиотический стресс, который влияет на рост и развитие сельскохозяйственных культур, приводя к потере прочности и повреждениям на поверхности. Эти симптомы вызваны изменениями в физической и химической организации клеточных мембран, среди других метаболических процессов [41]. Подсчитано, что частота, серьезность и продолжительность повышения экстремальных температур являются распространенной особенностью наших условий. Изменение климата контроли-

рует большие изменения температуры, что приводит к частым периодам похолодания. У восприимчивых к низким температурам растений замедлился рост, было ограничено использование ценных сортов и снижена урожайность. Растения используют отдельные стратегии, чтобы справиться со стрессовыми условиями и интегрировать различные физиологические, метаболические и молекулярные адаптации. Эти методы первоначально влекут за собой модификации для защиты растения, за которыми следует акклиматизация к холоду, что увеличивает выживаемость растения в условиях холодового стресса [11]. Хотя многим из этих механизмов способствуют факторы транскрипции (TFS), которые стимулируют экспрессию генов, связанных со стрессом, сеть транскрипции не ограничивается реакцией растений на холод [12]. Являясь основным элементом плазмы и эндомембран, липиды играют значительную организационную роль в смягчении воздействия низких температур [8]. Холодный стресс снижает рост и развитие растений, что влияет на физическую и химическую структуру клеточной мембраны, вызывает утечку электролитов и уменьшает протоплазматический поток и изменения в метаболизме клетки [9]. Дополнительные реакции на холод включают изменения в синтезе нуклеиновых кислот и белков, равновесии воды и питательных веществ, сродстве и конформации ферментов и дефиците фотосинтеза, в частности, понижающую регуляцию и фотоповреждение фотосистемы II (PSII) [16].

Изменения в структуре белков и липидных мембран помогают восстановить гомеостаз метаболитов и считаются механизмом, с помощью которого клетки чувствуют низкие температуры. Для своей метаболической и физической функции жидкое состояние плазматической мембраны является структурным и функциональным активом. При низких температурах плазматическая мембрана переходит из жидкого состояния при повышенных температурах в стадию жесткого геля [8]. Опосредованные низкой температурой изменения физической структуры мембраны происходят главным образом из-за повышенных уровней ненасыщенных липидов, которые повышают те-

кучесть и стабильность мембраны, позволяя клеткам механически адаптироваться к холоду [17].

Вывод. Перспективными исследованиями для научного и экономического развития являются также выявление видовых и сортовых особенностей механизмов морозостойкости стратегически важных садовых, древесных и сельскохозяйственных растений.

1.3. Действие низкотемпературного стресса на рост и развитие проростков пшеницы

Температура ограничивает рост, развитие и, соответственно, возможность достижения желаемого уровня урожая пшеницы, по крайней мере, по трем направлениям.

Известно, что температура на границе между почвой и снегом (если почва не замерзшая) составляет 0,5-1°C. Таким образом, учитывая, что снежный покров оставался на поле до второй половины февраля 1988 года, к этому времени пшеница успела взойти. При выпадении дождевых осадков сверх нормы весной и летом 1988 года был получен нормальный урожай. Все растения созрели почти одновременно, несмотря даже на то, что было зафиксировано две даты появления всходов, что свидетельствует об экологической пластичности этой культуры.

Методы выращивания сельскохозяйственных культур могут помочь пшенице в условиях холодного стресса. Методы:

- 1) улучшение качества семян;
- 2) посадка семян улучшенных сортов пшеницы с соблюдением соответствующей геометрии посадки в оптимальное время посева с точной посадкой;
- 3) экзогенное внесение осмопротекторов;
- 4) инокуляция семян ризобактериями;
- 5) управление питательными веществами;

б) управление орошением.

Выяснено положительное влияние методов заделки семян на различные культурные растения при холодовом стрессе. Загрунтованные семена при низкотемпературном стрессе показали повышенную скорость прорастания, улучшенную силу и равномерное формирование стебля, что привело к повышению качества урожая и урожайности. В настоящее время применяется множество методов грунтования, таких как гормональное грунтование, биологическое грунтование, окислительно-восстановительное грунтование и химическое грунтование. Наряду с холодовым стрессом, эти методы жизненно важны для улучшения экономического производства и качества пшеницы и других полевых культур.

Внекорневое внесение питательных веществ и гормонов роста - еще один эффективный агрономический подход к адаптации к низкотемпературному стрессу. Применение фитогормонов (т.е. стриголактона, АВА, салициловой кислоты (SA), жасмонатов) ускоряет различные белковые каскады, связанные с экспрессией генов устойчивости к холоду. Он также играет важную роль в передаче сигналов от корней к побегам и, как известно, эффективен для минимизации воздействия охлаждения и стресса от замерзания.

Кроме того, устойчивости роста пшеницы в неблагоприятных условиях окружающей среды можно достичь, следуя агрономическим принципам, таким как оптимальное время посадки, которое варьируется для разных регионов и сортов. Оптимальное время посева может определяться определенными климатическими факторами (т.е. температурой воздуха, температурой почвы и содержанием влаги в различных климатических условиях). Поскольку время посева зависит от климатических переменных, слишком сложно определить традиционные подходы к земледелию в условиях меняющихся климатических тенденций. Поэтому инструменты поддержки принятия решений при моделировании сельскохозяйственных культур очень полезны при оценке оптимального времени посева полевых культур. Инструменты моделирования урожая могут значительно улучшить

оценку лучших стратегий управления будущими климатическими угрозами.

Таким образом, срочно необходима адаптация междисциплинарных комплексных подходов для решения нескольких тревожных проблем изменчивости климата и обеспечения продовольственной безопасности растущего населения мира.

1.4. Действие низкотемпературного стресса на физиолого-биохимические процессы проростков пшеницы

Листья пшеницы могут выдерживать температуру $-7...-9^{\circ}\text{C}$, если они не прошли закалку, и $-12...-18^{\circ}\text{C}$ – после закалывания в зависимости от сорта и возраста листа. Старые (зрелые) листья более чувствительны, чем молодые (развивающиеся). Корни погибают при температуре $-3...-5^{\circ}\text{C}$, но это происходит редко, так как они защищены почвой.

Репродуктивные органы (колоски и цветки) могут быть повреждены при температуре $-2...-3^{\circ}\text{C}$. Нет ничего удивительного в том, что растения пшеницы генетически запрограммированы не выносить точку роста на поверхность почвы до тех пор, пока не аккумулируется необходимая сумма активных температур или дни не станут достаточно длинными для избегания угрозы заморозков.

Накопление растворимых сахаров – еще одна более простая тактика против холодового стресса. Растения, принадлежащие к семействам зерновых и злаковых, накапливают фруктаны (полимеры фруктозы, полученные из сахарозы) при воздействии холодной среды, которая играет роль стабилизатора в предотвращении мембраны; ученые также констатировали положительную корреляцию между накоплением фруктанов и устойчивостью к холоду у растений пшеницы с различной интенсивностью холодового стресса. Накопление углеводов в неоптимальных условиях частично способствует достижению устойчивости к холоду во время акклиматизации.

Хотя их специфическая роль при неоптимальной температуре до конца не изучена, они в первую очередь рассматриваются как совместимые осмопротекторы, поглотители АФК и сигнальные соединения. Некоторые исследования растений показали, что накопление олигосахаридов при воздействии холода закрепляет процесс акклиматизации, повышается роль трегалозы (дисахарида глюкозы) в регулировании способности переносить холод, и предполагается, что она участвует в накоплении крахмала.

Исследования фотосинтеза показали, что некоторые сорта озимой пшеницы, по сравнению с яровой пшеницей, поддерживают усвоение углерода даже при низких температурах, что связано с повышенными концентрациями ферментов биосинтеза сахарозы. Следовательно, яровой пшенице не хватает поддержания углеродного обмена в суровых условиях низких температур. Аналогичным образом, другое исследование на яровой и озимой пшенице показало повышенное содержание углеводов (т.е. сахарозы, фруктозы и глюкозы) в озимой пшенице, но не было обнаружено увеличения у яровой пшеницы, и это также подтвердило роль углеводов в неспособности посевов пшеницы противостоять низкотемпературным стрессам весной. Роль растворимых сахаров в реакции растений на сигнал холода может быть дополнительно исследована с помощью передовых молекулярных методов для изучения того, как сахар регулирует экспрессию генов в холодной среде.

Холодный стресс вызывает морфологические, физиологические, биохимические и молекулярные изменения в пшенице. Хотя большинство сортов озимой пшеницы, как правило, переносят такие сильные экстремальные низкие температуры, длительное воздействие может привести к частичному, а иногда и полному разрушению конечного продукта. Такая зависимость среда/климат вызывает многочисленные изменения на протяжении всего жизненного цикла урожая, от прорастания до сбора урожая. На ранней стадии роста неоптимальная температура подавляет рост проростков и тормозит процесс развития в виде уменьшения размера листьев, уменьшения удлинения цветonoса и уменьшения количества побегов и шипов.

На репродуктивной стадии холодный стресс приводит к бесплодию пыльцы, аборт цветков, снижению оплодотворения, задержке созревания и уменьшению количества зерен. Впоследствии это приводит к значительным потерям урожая. Кроме того, хорошо объяснено, как низкотемпературный стресс влиял на физиологические и биохимические процессы, включая фотосинтез, дыхание, энергетический дисбаланс, питательные вещества и водные отношения. Кроме того, для борьбы с холодным стрессом культурные растения проявляют несколько биохимических и молекулярных проявлений. Кроме того, реакцию пшеницы на холод можно лучше регулировать путем интеграции селекционных и агрономических подходов, таких как фенотипический скрининг генов устойчивости к холоду, предпосевная обработка семян и экзогенное применение гормонов роста.

Из-за неожиданных изменений климата в последние несколько десятилетий зима становится короче и суровее, что наносит ущерб озимым злакам. Существует большая потребность в изучении и сосредоточении внимания на генетических особенностях пшеницы, благодаря которым она выдерживает холодный стресс и продолжает свой нормальный рост и развитие. В этом отношении традиционное разведение будет способствовать использованию источников дикой пшеницы, которые лучше адаптируются к естественным условиям окружающей среды. Он был дополнительно улучшен путем выявления разнообразных генетических признаков и картирования с помощью различных инструментов картирования генов, таких как картирование QTL и общегеномные ассоциативные исследования (GWAS). Кроме того, точное и правильное редактирование генов, такое как система CRISPR-Cas9, будет включать высокоурожайные сорта с использованием методов генной инженерии. Это также поможет в обеспечении глобальной продовольственной безопасности, как в качественном, так и в количественном аспектах.

Помимо этого, многие другие осмолиты (такие как глицинбетаин) и растительные гормоны (такие как брассиностероиды, ABA, SA, стриголактон) все еще недостаточно используются и легче регулируют реакцию расте-

ний на холодовой стресс. Вот почему в настоящее время необходимо внедрение комплексных междисциплинарных подходов для изучения этих недостающих звеньев и изучения новых горизонтов исследований.

Утверждается, что противодействие растений низкотемпературному стрессу осуществляется путем обнаружения (восприятия) стресса с последующим восприятием сигнала, трансдукцией и индукцией экспрессии генов, устойчивых к холоду. В пшенице было обнаружено множество генов, чувствительных к холоду, которые, среди прочего, распознаются как дегидрин (DHN), обилие позднего эмбриогенеза (LEA), чувствительность к холоду (COR) и чувствительность к абсцизовой кислоте (RBA). Эти гены подразделяются на две части: во-первых, те, которые непосредственно реагируют на низкотемпературный стресс, и, во-вторых, те белки, которые принимают участие в регуляции других молекулярных экспрессий. В ответ на холодные условия эти белки выполняют несколько других функций, поскольку они также участвуют в противодействии другим абиотическим стрессам, таким как засуха и засоление. Во время устойчивости к холоду генерируются множественные генные экспрессии (*Arabidopsis*, COR и *Wheat*, WCS), которые впоследствии запускают каскад транскрипционных, биохимических и физиологических событий, жизненно важных для устойчивости растения к холоду. Эти регуляторные реакции на холод включают высвобождение Ca^{2+} , накопление осмолитов и снижение содержания воды, поглощение АФК и регулирование метаболизма углерода. Экспрессия генов у озимой пшеницы против холодового стресса генерируется через 1 день, поскольку полная экспрессия генов обязательно требует частого воздействия холода. Необходимая пороговая температура для запуска этого механизма устойчивости варьируется в пределах двух разных сортов одного и того же вида; сорт озимой пшеницы Норстар и сорт яровой пшеницы Мейнту имеют рациональные пороговые температуры 18 и 8°C соответственно. Для наилучшей холодной акклиматизации температура должна опускаться ниже порогового уровня, поскольку скорость акклиматизации обратно пропорциональна падению темпе-

ратуры.

Таким образом, основные причины гибели клетки при низких отрицательных температурах состоят в обезвоживании и механическом сжатии льдом, повреждающим клеточные структуры. Основное негативное влияние низких температур – повреждения мембранных систем активного транспорта, а также липидных компонентов мембран. Происходит денатурации мембранных белков, связанная с дегидратацией и высаливанием макромолекул, что способствует инактивации активного транспорта (АТФ-аз тонопласта и плазмалеммы). Мембраносвязанные ферментативные системы являются наиболее чувствительными в клетке. Их инактивация вызывается накоплением вплоть до токсических концентраций неорганических и органических веществ, образующихся вследствие дегидратации клеток в процессе замерзания. Потеря мембранами свойства полупроницаемости определяет дальнейшие повреждения клеток.

Изменения в белках и липидах вызывают различного рода нарушения метаболизма, и одно из них – подавление биохимической и фотохимической активности хлоропластов. В частности, снижается скорость ассимиляции углерода (темновая стадия). Происходит также подавление фотофосфорилирования, что связано со снижением АТФ-синтазной активности, что приводит к падению уровня АТФ. Такой эффект наблюдается при отрицательных и низких положительных температурах, а также при засухе и почвенном засолении. Ингибирование ферментов служит причиной повреждения метаболизма клеток: нарушается фото- и окислительное фосфорилирование, усиливается гидролиз фосфолипидов, повышается активность фосфолипаз.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Известно, что реакция растений на воздействие низких температур закаливания сопровождается широким спектром структурно-функциональных изменений (Трунова, 2007). В частности, при холодовом закаливании пшеницы происходят изменения ультраструктурной организации клеток листа, содержания фотосинтетических пигментов и активности протеиназ (Венжик и др., 2008). Важно отметить, что эти изменения регистрировались в первые часы воздействия пониженной температуры и имели явное приспособительное значение. В то же время изменения функциональной активности фотосинтетического аппарата (ФСА) растений могут происходить и в процессе холодового закаливания, например, влияющие на скорость роста листьев (Климов, 1987; Мирославов, 1994; Hurry et al, 1995), интенсивность фотосинтез (Bubolo et al., 1988; Климов, 2003), активность ферментов фотосинтетического цикла (Strand et al., 1999; Yamasaki et al., 2002), параметр флуоресценции хлорофилла (Aroca et al., 2001; Rapacz et al., 2004) и др. Однако в литературе почти нет данных о порядке появления этих изменений, хотя такие сведения чрезвычайно важны для понимания характера адаптации растений.

Ботаническое описание пшеницы. Среди других родов, входящих в семейство Мятликовые (*Poaceae*) пшеница (*Triticum* L.) отличается наибольшим полиморфизмом. Она представлена большим количеством видов, разновидностей, экологических типов и форм. Все виды пшеницы относятся к однолетним травянистым растениям. Корневая система пшеницы мочковатая, сильно развитая; представлена первичной корневой системой, развивающейся из зародыша, и вторичной – из узлов кушения. В зависимости от условий произрастания корни могут проникать на глубину 1,5-2 м и более.

Стебель – соломина, состоящая из 5-7 междоузлий. Высота его в зависимости от вида, сорта и условий произрастания колеблется от 50-70 до 200 см. Растение пшеницы способно образовывать большое количество стеблей из почек, расположенных в узле кушения. Лист пшеницы состоит из влага-

лища и листовой пластинки. На месте перехода влагалища в пластинку имеется тонкая бесцветная пленка, называемая язычком. Язычок плотно прилегает к стеблю, препятствуя проникновению воды внутрь листового влагалища. У основания листового влагалища расположены ушки (рожки), охватывающие стебель. Язычок у пшеницы короткий, ушки небольшие, ясно выраженные, часто с ресничками.

Растения пшеницы образуют прикорневые и стеблевые листья. Прикорневые формируются из подземных узлов, стеблевые – на надземной части стебля. Не кустящееся растение за период вегетации образует от 7 до 12 листьев. При обильном кущении одно растение за период вегетации может сформировать 100 листьев и более.

Соцветие – колос, который состоит из членистого колосового стержня и колосков. Колосовой стержень коленчатый, на каждом колене размещается по одному колоску. Колосок состоит из двух колосковых чешуй, одного или нескольких цветков. В каждом цветке по две цветковые чешуи — нижняя (наружная) и верхняя (внутренняя). Нижняя колосковая чешуя у остистых сортов несет ость. Между цветковыми чешуями находятся завязь с двумя перистыми рыльцами и три тычинки. У основания завязи размещаются две бесцветные пленки – лодикулы. Плод – зерновка, которую в повседневном обиходе называют зерном. Размеры зерна в зависимости от вида, сорта и условий выращивания могут колебаться: длина от 4 до 8 мм, ширина от 1 до 2,2 мм, толщина от 1,5 до 3,5 мм. По отношению длины к ширине выделяют группы зерна: длинное и узкое (2,5-3,5 : 1), яйцевидное или овальное (1,7-2,5 : 1), шаровидное (1-1,5 : 1). Этот признак наряду с другими используется при определении сортовой принадлежности.

Масса одного зерна пшеницы в зависимости от условий произрастания и сортовых особенностей колеблется от 15 до 88 мг. У большей части сортов озимой пшеницы, возделываемых в нашей стране, при благоприятных условиях выращивания она варьирует от 35-37 до 45-50 мг.

Нормально развитое зерно озимой пшеницы состоит из зародыша, эн-

досперма и оболочек. Соотношение отдельных частей зерна зависит от условий выращивания, сорта. На долю эндосперма приходится 77-84 %, на долю зародыша 2-4 % и на долю оболочек с алейроновым слоем 14-20 % массы зерна. Зерно пшеницы покрыто двумя оболочками – плодовой и семенной. Плодовая оболочка развивается из стенок завязи и состоит из трех слоев – продольного, поперечного и трубчатого. Из удлиненных клеток продольного слоя на верхушке зерна развивается хохолок. Семенная оболочка формируется из стенок семязпочки и располагается под плодовой оболочкой. Она состоит из трех слоев: наружного (водонепроницаемого), внутреннего (пигментного) и гиалинового (набухающего).

Под оболочками в нижней части зерна располагается зародыш. Иногда можно встретить зерно без зародыша, что является следствием нарушения двойного оплодотворения, присущего злаковым хлебам. Зародыш состоит из щитка, корешков, стебля с почкой и зачаточных листьев.

Щиток у хлебных злаков представляет собой единственную семядолю. Он отделяет зародыш от эндосперма. Наибольшая часть зерновки пшеницы представлена эндоспермом. Эндосперм – внутреннее содержимое зерна, исключая зародыш. Там сосредоточено более 95% питательных веществ от общего количества, содержащихся в зерне. По строению эндосперм неоднороден. Наружный слой, непосредственно примыкающий к оболочкам – алейроновый, резко отличается от внутренней части эндосперма – мучнистой.

Алейроновый слой состоит из одного ряда крупных клеток. Толщина его изменяется в больших пределах – от 20 до 70 мкм, постепенно уменьшаясь в нижней части зерна. У стекловидного зерна алейроновый слой толще, чем у мучнистого. Клетки алейронового слоя заполнены шаровидными прозрачными алейроновыми зернами и протоплазмой желтоватого цвета. На долю алейронового слоя приходится 6-8% массы зерна. Под алейроновым слоем расположена мучнистая часть эндосперма. Клетки мучнистой части зерна крупные с очень тонкими стенками. На границе с алейроновым слоем они мельче и нередко плотно слипаются с ним.

В посевах пшеница представлена двумя видами – мягкой и твердой. Оба эти вида имеют яровые, полуозимые и озимые формы. Несмотря на их принадлежность к одному роду, твердая и мягкая пшеница различаются между собой по некоторым морфологическим признакам и хозяйственной ценности.

Биологические особенности пшеницы. В процессе онтогенеза озимая пшеница проходит следующие фенологические фазы: всходы, кушение, выход в трубку, колошение, цветение, созревание. Первая фаза и часть второй проходят осенью, остальные – весной и летом следующего года.

Оптимальные условия для прорастания семян озимой пшеницы наблюдаются при влажности почвы 60-70 % от полевой влагоёмкости и температуре 12-20°C. При таких параметрах зерно прорастает через 4-6 дней. В отличие от ржи зерно пшеницы, как правило, прорастает пятью корешками.

Фаза всходов наступает при появлении первого настоящего листка. Скорость появления всходов зависит от температуры, влажности почвы и глубины заделки семян. При оптимальной влажности почвы и количестве среднесуточных температур 120-130°C всходы озимой пшеницы появляются на 7-9 день после посева. Эта и наступление других фаз регистрируются, когда в данную фазу вступили 70% растений. Всходы отмечаются при появлении проростков высотой 3-4 см.

При благоприятном сочетании влаги и тепла через 7-12 дней после появления на поверхности почвы, первый лист заканчивает своё развитие. Благодаря фотосинтетической деятельности первого листа и минерального корневого питания на 3-7-й день после развёртывания первого листа появляется второй лист, через 3-6 дней после второго появляется третий, а затем и четвёртый лист. Причём каждый последующий лист по размеру больше предшествующего. Самый крупный лист – верхний.

Общая продолжительность фазы всходов озимой пшеницы при нормальных условиях увлажнения и тепла колеблется от 14 до 25 дней.

Кушение. Появление новых побегов у пшеничного растения представ-

ляет собой процесс подземного ветвления стебля и носит название кушения, а место (узел), где берут начало новые побеги – узлом кушения и укоренения. Фаза фиксируется по появлению шильца листа первого бокового побега из пазухи первого листа. Нормальное кушение по данным ряда авторов, проходит при температуре воздуха 10-12°C и влажности почвы 60-70% от полной полевой влагоёмкости. При среднесуточной температуре воздуха 13-18°C, кушение совпадает с моментом образования четвёртого листа, то есть через 10-15 дней после появления всходов. Сумма среднесуточных температур воздуха за этот период равна 230-250. Продолжительность осеннего кушения составляет в среднем 25-30 дней, весеннего 30-35 дней. В полевых условиях при оптимальных сроках сева растения озимой пшеницы формируют обычно 3-7 побегов. Осеннее кушение прекращается до установления температуры ниже +3°C, весной возобновляется при 5-10°C.

Выход в трубку (стеблевание). Через 30-40 дней после начала весенней вегетации озимая пшеница выходит в трубку. В агрономической практике началом фазы выхода в трубку принято считать время, когда сближенные междоузлия, состоящие из узлов будущего стебля, прощупываются руками в пазухах листьев на высоте 3-4 см. Стебли главных побегов образуют 5-8 междоузлий. Сформированные весной побеги имеют 3-4 междоузлия. В фазе выхода в трубку интенсивно нарастает вегетативная масса. Благоприятные условия прохождения фазы выхода в трубку создаются при влажности почвы 70-80% от полной полевой влагоёмкости, температуре воздуха 15-18°C, хорошем минеральном питании и сумме среднесуточных температур 430-450°C.

Колошение. Фаза колошения отмечается с появлением у растений верхней половины колоса из влагалища флангового листа. В зависимости от погодных условий оно наступает на 25-30 день после начала выхода в трубку. Этот период органогенеза наиболее важен для пшеницы и называется критическим. В фазе колошения растения нуждаются в повышенном минеральном питании, особенно в азоте. Фаза колошения проходит нормально

при температуре воздуха 18-25 С, длине дня 14-16 часов, влажности почвы 60-70% от полной полевой влагоёмкости.

Цветение и оплодотворение. Через 2-3 дня после колошения озимая пшеница зацветает. Начинается цветение колосков, расположенных в средней части колоса, и распространяется вниз и вверх по колосу. Продолжительность цветения одного колоса 3-5 дней, а всего поля 6-7 дней. Наиболее интенсивно озимая пшеница цветёт в утренние (с 7 до 11) и в вечернее (с 17-22) часы. Пшеница относится к самоопыляющимся растениям, однако она опыляется и перекрёстно. Перекрёстное опыление биологически полезно, так как повышается жизнеспособность растений, оно применяется при получении обновлённых семян в делянках первичного семеноводства.

Пшенице свойственно двойное оплодотворение. После оплодотворения цветков пшеницы закрывается, рост вегетативной массы практически прекращается, замедляется и рост корней. Наиболее благоприятные условия для цветения и оплодотворения складываются при температуре 20-25°С, влажности почвы на уровне 75-80% полевой влагоёмкости. В период цветения недостаток влаги в почве и сухие южные ветры вызывают стерильность пыльцы растений пшеницы, что приводит к череззернице колоса.

Формирование зерна. После оплодотворения завязи начинается физиологические процессы формирования зерна, и, в первую очередь – оболочек и эндосперма. Продолжительность формирования эндосперма и зародыша продолжается 10-14 дней. К концу фазы формирования уменьшается содержание воды до 65-70% и накапливается 25-30% сухого вещества от массы зрелого зерна.

Молочная спелость. Фаза молочной спелости характеризуется интенсивным накоплением минеральных веществ в зерне. К концу фазы в зерне содержится до 90% сухих веществ, масса 1000 зерен увеличивается вдвое. Поэтому в агрономической практике фазу молочной спелости называют фазой «налива» зерна. К концу фазы содержание воды в зерне составляет 50% общей массы. Продолжительность этой фазы длится 10-12 дней. Сухая и

жаркая погода сокращает этот период до 5-6 дней, при этом сформируется щуплое зерно.

Восковая спелость. Основным признаком наступления этой фазы служит изменение окраски зерна с зелёной на жёлтую. В этот период ассимиляция листьев прекращается полностью, влажность зерна в конце фазы снижается с 35-40 до 20-22%.

Полная спелость наступает, когда зерно твердеет и не режется ногтем. В эту фазу зерно полностью теряет связь с материнским растением. Содержание воды уменьшается до 15-16% и ниже. Стебель желтеет и полностью высыхает. При нормальной погоде в Мордовии пшеница готова к обмолоту 25-30 июля.

Требования озимой пшеницы к температуре. Семена озимой пшеницы начинают прорастать при температуре 1-2°C, но прорастание идет медленно. Для дружного прорастания и появления всходов нужна более высокая температура (12-15°C). При температуре 14-16°C и наличии влаги в поверхностном слое почвы всходы появляются через 7-9 дней. Сумма эффективных температур за период посев — всходы составляет 116-139°C. Для процесса ассимиляции минимальной температурой считается 3-4°C. С повышением температуры и при других благоприятных условиях усвоение углерода возрастает, но при 35-36°C процессы ассимиляции замедляются. В зимне-весенний период озимая пшеница чувствительна к низким температурам и резким ее колебаниям. В южных и юго-восточных районах очень опасны колебания температуры ранней весной, когда днем она поднимается до 5-10°C, а ночью снижается до -10°C. Без снега озимая пшеница гибнет при температуре -16....-18°C. Современные селекционные сорта (Мироновская 808, Альбидум 114 и др.) отличаются большой устойчивостью к пониженным температурам и способны выдерживать зимние морозы до 25-30°C.

Хозяйственное значение пшеницы. Озимая пшеница принадлежит к числу наиболее ценных и высокоурожайных зерновых культур. Зерно богато клейковинными белками и другими ценными веществами, поэтому оно ши-

роко используется для продовольственных целей, в особенности в хлебопечении и кондитерской промышленности, а также для производства крупы, макарон, вермишели и других продуктов. Пшеничные отруби – высококонцентрированный корм для всех видов сельскохозяйственных животных. Солома и мякина имеют большую кормовую ценность. Солому в измельченном и запаренном виде или обработанную химическими веществами охотно поедают крупный рогатый скот и овцы. В 100 кг соломы содержится 0,5-1,0 кг перевариваемого протеина, 20-22 кормовых единицы. Солома используется как строительный материал, для изготовления бумаги, подстилки животным и т. д. В некоторых районах Центрально-Черноземной зоны и других районах озимая пшеница используется в качестве зеленого корма.

Ботаническая характеристика сорта «Московская 39». Сорт мягкой озимой пшеницы Московская 39 создан НИИСХ Центральных районов Нечерноземной зоны (НИИСХ ЦРНЗ). Родословная сорта – индивидуальный отбор из гибридной популяции (Обрий × Янтарная 50). Авторы: Б.И. Сандухадзе, Е.Т. Вареница, Г.В. Кочетыгов.

Внешнее описание сорта: куст промежуточный, высота растений 91-100 см, соломина полая, средней толщины, опушение верхнего узла слабое, восковой налет на верхнем междоузлии от среднего до слабого. Флаговый лист имеет восковой налет на влагалище и нижней стороне листовой пластинки от среднего до сильного. Антоциановая окраска ушек очень слабая, колос веретеновидный, белый, средней плотности, восковой налет средний. Ости прямые, 5-6 см, белые, колосковая чешуя овально-яйцевидная, средней длины и ширины, нервация выражена слабо. Зубец заостренный, плечо прямое, средней ширины, киль сильно выражен. Зерно средней крупности, красное, удлинённо-яйцевидной формы, основание зерна голое, хохолок короткий, бороздка средняя.



Рисунок 4. Озимая пшеница (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39

Масса 1000 зерен: 34-42 г.

Средняя урожайность: по Центральному региону – 28,6 ц/га, на 1,0 ц/га ниже среднего стандарта.

Максимальная урожайность: 59,4 ц/га получена в Тульской области.

Группа спелости: среднеспелый.

Вегетационный период: 305-308 дней, на уровне стандарта.

Зимостойкость: на уровне стандартного сорта Березина.

Устойчивость к полеганию: пол устойчивости к полеганию незначительно превышает стандарт.

Устойчивость к заболеваниям: устойчив к пыльной, твердой головне и септориозу, восприимчив к бурой ржавчине и мучнистой росе. Требуются фунгицидные обработки посевов в период вегетации по рекомендации службы защиты растений.

Основное достоинство сорта. Устойчив к твёрдой головне, снежной плесени и септориозу, в средней степени поражается бурой ржавчиной и мучнистой росой. Обладает высокими хлебопекарными качествами, содержание белка выше стандарта на 1,5-2,0% и клейковины – на 6-8%. По данным оригинатора, содержание белка в зерне 14-16%. Московская 39 признана

лучшим сортом озимой пшеницы по итогам Международного испытания в Канаде в 1998-2000 г. Сорт Московская 39 предназначен для получения продовольственного зерна (сильная пшеница) в Центральном, Центрально-Черноземном регионах России, перспективен и для сопредельных регионов. Обладает высокой технологичностью возделывания, отзывчив на удобрения, практически не полегает, имеет повышенные показатели в производстве. Сбор высококачественного зерна составляет 35-50 ц с 1 га.

В ходе работы были проведены лабораторные опыты.

Описание опыта. Опыты были проведены с проростками озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39, выращенными в чашках Петри при комнатной температуре (+24°C). В недельном возрасте проростки подвергали воздействию низких положительных температур +4°C и низких отрицательных температур –6°C, при прочих равных условиях. Контрольный вариант оставался при 24°C. Все измерения проводили на первом листе проростков пшеницы.

Варианты опыта:

1. Контроль – проращивание зерновок пшеницы и последующее выращивание проростков на дистиллированной воде в нормальных условиях (+24°C).



Рисунок 5. Выращивание пшеницы в нормальных условиях

2. Опыт 1 – проращивание зерновок пшеницы и последующее выращивание проростков на дистиллированной воде и последующее воздействие низкими положительными температурами ($+4^{\circ}\text{C}$) в течении 24 часов.



Рисунок 6. Воздействие на проростки пшеницы низкими положительными температурами

3. Опыт 2 – проращивание зерновок пшеницы и последующее выращивание проростков на дистиллированной воде и последующее воздействие низкими отрицательными температурами (-6°C) в течении 1 часа.



Рисунок 7. Воздействие на проростки пшеницы низкими отрицательными температурами

Условия проведения опыта:

В течение 7 дней проращивали семена и выращивали проростки пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.) сорта «Московская 39» на дистиллированной воде.

Для создания стрессовых условий применяли воздействие низкими положительными (+4°C) и низкими отрицательными (–6°C) температурами. Воздействие проводилось однократно в течение 24 часов и 1 часа соответственно.

Методы измерения исследуемых показателей:

Накопление в проростках пшеницы свободного пролина оценивали по методу Л. Бейтса (Bates, 1973). Содержание аминокислоты определяли колориметрическим методом. Подготовленный материал массой 0,5 г гомогенизировали в 10 мл 3% водного раствора сульфосалициловой кислоты. Гомогенат отфильтровывали через бумажный фильтр. Из фильтрата отбирали 2 мл в пробирку с притертой пробкой, прибавляли 2 мл реагента и 2 мл ледяной уксусной кислоты. Смесь тщательно перемешивали, ставили на водяную баню (100°C) на 1 час, потом охлаждали до +4°C. После этого в каждую пробирку добавляли по 4 мл толуола, перемешивали 20-30 с и давали смеси настояться. Происходил переход красителя в верхний слой. Интенсивность окраски определяли на спектрофотометре при 520 нм. По калибровочной кривой определяли содержание пролина. В качестве стандарта использовали аминокислоту пролин (“Sigma”, США).

Активность полифенолоксидазы и пероксидазы определяли по методу Бояркина [9].

Далее результаты исследований были статистически обработаны по общепризнанным методикам [16,55].

ГЛАВА 3. ДЕЙСТВИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА НА РОСТ, РАЗВИТИЕ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРО- ЦЕССЫ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

3.1 Содержание пролина у растений пшеницы в условиях стресса

Система антиоксидантной защиты многокомпонитна. Она включает не только антиоксидантные ферменты, но и другие органические, такие, например, как пролин – один из универсальных совместимых осмолитов. Он накапливается при стрессе, имеет выраженные антиоксидантные свойства, проявляя при этом и осмопротекторный эффект. Возможно, что пролин является одним из компонентов стресс – реакции, одной из стадий адаптации [54,14,22]. В это время проявляется его протекторный эффект. Проллин реагирует с макромолекулами, стабилизируя их интактную гидратационную сферу. Это предотвращает инактивацию белков, сохраняет их пространственную структуру и биологическую активность. Все это также способствует сохранению целостности структуры мембран.

Значения влияния низких положительных и низких отрицательных температур на содержание пролина в растениях пшеницы представлены в таблице 1.

*Таблица 1 – Влияние низких положительных и низких отрицательных температур на содержание пролина в проростках пшеницы в условиях стресса (M=t, n=4-5 * – $p \leq 0,05$ по отношению к контролю)*

Варианты опыта	Содержание пролина, мг/г сырого веса
Контроль	0,806 ±0,003
Опыт 1	0,952±0,001*
Опыт 2	1,119±0,01*

Пролин – как АК, играет важную роль – является структурным компонентом белков. У растений накопление пролина происходит после воздействия низких и высоких температур, после увеличения концентраций NaCl и тяжелых металлов, окислительном стрессе и воздействии УФ-излучения. Уровень накопления пролина в условиях стресса различен у разных видов и может быть больше исходного более чем в 100 раз. Накопление пролина во время осмотического стресса – это составной результат увеличения синтеза, уменьшения скорости его деградации и активного транспорта между компартментами клетки и частями растения.

Снижение связанной воды в клетках может привести к различным нарушениям в функциях и структуре биополимеров, в частности может происходить денатурация белков и подавляться их ферментативная активность, может изменяться структура липидного бислоя мембран и нарушаться их целостность. В данном случае осморегуляция может осуществляться за счет накопления в клетках низкомолекулярных веществ. Например, в цитоплазме синтезируются осмолиты. Примером осмолитов является аминокислота пролин. Осмолиты выполняют защитную функцию – протекторную. Осмолиты сохраняют гидратные оболочки биополимеров. В отличие от Na^+ и Cl^- осмолиты, не проникают через гидратную оболочку и не вступают в контакт с белком, но создают препятствие для разрушения ионами гидратной оболочки белка и его денатурацию.

В ходе опыта было установлено, что стресс, вызванный низкими положительными температурами, вызывал повышение активности пролина на 18% по сравнению с контролем. Низкие отрицательные температуры вызвали повышение активности пролина на 38%, что свидетельствует о повышении стрессового воздействия.

Таким образом, можно предположить, что защитные механизмы, формирующиеся в ходе акклимации у проростков пшеницы, включают перераспределение доли свободной и связанной воды с одновременным увеличением содержания пролина.

3.2 Действие низкотемпературного стресса на активность пероксидазы у проростков пшеницы.

Пероксидаза – фермент, обладающий достаточной функциональной лабильностью, способный выполнять разнообразные функции в живых организмах. Важной функцией пероксидазы, наряду с каталазой — защита организма от неблагоприятного воздействия перекиси водорода и других активных форм кислорода, которые могут образовываться при окислительном стрессе. Пероксидазы – семейство гемсодержащих энзимов, включает три класса пероксидаз: внутриклеточные пероксидазы; пероксидазы, характерные для грибов; секреторные пероксидазы.

Секреторные пероксидазы катализируют восстановление перекиси водорода, в качестве донора электронов используются различные молекулы, такие как аскорбиновая кислота, фенолы (пирокатехин), глутатион, ароматические кислоты, адреналин. Данный класс пероксидаз обнаружен практически во всех частях клетки: в мембранах глиоксисом, пероксисом, митохондрий, в цитозоле, хлоропластах (в строме и в мембранах тилакоидов), клеточной стенке.

В целях выявления возможных механизмов действия низкотемпературного стресса на активность пероксидаз была поставлена серия опытов с проростками пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.) сорта «Московская 39». Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Влияние низких положительных и низких отрицательных температур на содержание пероксидазы в проростках пшеницы в условиях стресса ($M=t$, $n=4-5$ * – $p \leq 0,05$; *** – $p \leq 0,001$ по отношению к контролю)

Варианты опыта	Время, с.	Активность фермента, ед/г*с
Контроль	112	$0,837 \pm 0,0003$
Опыт 1	97	$0,966 \pm 0,0004^*$
Опыт 2	64	$1,476 \pm 0,0003^{***}$

Применение низких положительных температур приводило к повышению активности пероксидаз на 15,5% по сравнению с контролем, при воздействии же низких отрицательных температур активность пероксидаз возросла на 76%. Под влиянием низких температур в проростках пшеницы возрастает активность ферментов, данный факт многие авторы связывают с важной ролью пероксидаз в анаэробном дыхании озимых культур в зимнее время [25].

Активность пероксидаз, видимо, мешает накоплению H_2O_2 в клетке. Используя для окисления перекись водорода, пероксидазы играют значительную роль в ликвидации продуктов вторичного обмена (фенолов), в регулировании гормонального статуса растений при помощи окисления 3-индолилуксусной кислоты, так же пероксидазы участвуют в процессах синтеза лигнина клеточной стенки [33].

Рассматривая реакцию растений на стресс, можно выделить три фазы его развития: первичную стрессовую реакцию, адаптацию, истощение ресурсов надежности.

В первую фазу выявляются значительные отклонения в физиолого-биохимических процессах. Если воздействие велико — растение может погибнуть в течение первых часов, если же такого не произошло, реакция переходит во вторую фазу.

Во второй фазе организм либо приспосабливается к новым условиям, либо повреждения становятся сильнее. При не сильном развитии неблагоприятных условий организму проще к ним приспособиться. Растение нормально вегетирует в данных условиях при общем пониженном уровне процессов.

В фазу истощения гидролитические процессы в организме усиливаются, подавляются энергообразующие и синтетические реакции. При сильном воздействии стресса растение погибает. При прекращении стресса и нормализации условий среды начинаются процессы восстановления и ликвидация повреждений.

Можно сделать вывод, что измерение активности пероксидаз происходило во время фазы адаптации растения к новым условиям, когда активность всех ферментов возрастает.

3.3 Действие низкотемпературного стресса на активность полифенолоксидазы у проростков пшеницы.

В основе устройства действия негативных факторов среды лежит окислительный стресс, который проявляется в увеличении образования активированных форм кислорода [31]. Есть мнения, что вследствие этого будет изменяться активность ряда ферментов, например, таких как полифенолоксидаза.

Полифенолоксидаза – фермент, который содержит медь, субстратами данного энзима могут быть катехолы, хлорогеновая, галловая кислота, пирокатехин и другие о-дифенолы. Полифенолоксидаза ускоряет реакцию окисления моно-, три- и полифенолов, а также о-дифенолов с образованием соответствующих хинонов, при этом, акцептором водорода служит кислород, который может формироваться в клетке в результате окислительного стресса. В физиологии, роль данного фермента остается недостаточно ясной. Отмечено изменение ее активности в онтогенезе растений (активизация полифенолоксидазы при старении), при патогенезе и различного рода повреждениях.

Доказательств существования конкретного механизма, объясняющего связь между полифенолоксидазой и абиотическим стрессом, не найдено. Наряду с этим активность полифенолоксидазы может быть связана с накоплением активных форм кислорода и изменением окислительно-восстановительного статуса, энзим может участвовать в буферном распределении кислорода и снижении интенсивности фотосинтеза.

Важной особенностью фермента является минимальное сродство к кислороду, исходя из этого, чтобы выявить максимальную активность фермента необходима хорошая аэрация субстрата.

Активность полифенолоксидазы можно выявить с помощью измерения скорости окисления фенолом (в ультрафиолетовой области спектра) или же по появлению окрашенных продуктов. Данный механизм реакции достаточно сложен, так как связан с образованием ряда последующих полимерных продуктов. В связи с этим, определение активности полифенолоксидазы по скорости образования окраски в реакционной смеси возможно только на самом начальном этапе реакции.

В целях определения возможных механизмов влияния низкотемпературного стресса на активность полифенолоксидазы была поставлена серия опытов с проростками пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.) сорта «Московская 39». Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Влияние низких положительных и низких отрицательных температур на содержание полифенолоксидазы в проростках пшеницы в условиях стресса ($M=t$, $n=4-5$ ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$ по отношению к контролю)

Варианты опыта	Оптическая плотность	Активность фермента, ед/г*с
Контроль	0,876	$0,584 \pm 0,003$
Опыт 1	1,338	$0,892 \pm 0,001^{**}$
Опыт 2	1,584	$1,056 \pm 0,01^{***}$

Полифенолоксидаза – один из ферментов, участвующих в защите растений от воздействия патогенов и абиотических стрессовых факторов. По результатам проведенного опыта, мы выяснили, что при воздействии стрессора в виде низких положительных и низких отрицательных температур, активность полифенолоксидазы по сравнению с контролем повышается на 52% и 80% соответственно. По мнению ряда авторов, увеличение экспрессии генов полифенолоксидазы при действии стрессовых факторов, напрямую связано с устойчивостью растений. При возникновении стрессовых условий активность полифенолоксидазы возрастает, при этом происходит образование химических барьеров, препятствующих дальнейшему распространению актив-

ных форм кислорода. Принимая участие в регуляции метаболизма, полифенолоксидаза способствует адаптации растения к изменяющимся условиям окружающей среды

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Способность растений переносить холод без повреждения их цикла роста называется «холодоустойчивостью». Реакцию растений на индуцирование холодного стресса можно разделить на четыре различные фазы: первоначальная тревожная реакция, акклиматизация (повышение устойчивости к замораживанию, связанное с воздействием низких, но не замораживающих температур), восстановление и разрушение, если стресс продолжается или серьезен – увеличивается. Кроме того, после холодного стресса (т. е. повышения температуры с холодной до оптимальной) активируется врожденная реакция восстановления, обеспечивающая регенерацию растений, активный процесс после прекращения стресса, и жизненно важный для дальнейшего роста и развития растений. Хотя способность к регенерации зависит от интенсивности стресса, с которым растение ранее столкнулось, ее можно усилить путем экзогенного применения определенных гормонов (например, ауксина, цитокинина и стриголактона). Культурные растения умеренного климата, включая пшеницу, как правило, преодолевают холодный стресс за счет холодной акклиматизации. Холодовая акклиматизация озимой пшеницы может быть достигнута путем замораживания (способность растения выдерживать минусовую температуру до определенного срока). Этот процесс осуществляется посредством многих транскрипционных и физиологических корректировок, включая активацию генов, регулируемых холодом, последующая регуляция фотосинтеза, накопление осмопротекторов и стимуляция антиоксидантной системы.

Для поддержания стабильности урожая и уменьшения негативного воздействия внезапных похолоданий принятие надлежащих управленческих и агротехнических методов (т.е. метода посева, времени и внесения удобрений) довольно удобно для ограничения риска повреждения морозом. Также необходимо создавать устойчивые к холоду сорта пшеницы. Механизм защиты пшеницы от холода может быть улучшен путем внедрения интегрированных

междисциплинарных систем, включая скрининг генов, устойчивых к холоду, с помощью современных методов картирования генов и создания холодоустойчивых сортов, предпосевной обработки семян и применения совместимых гормонов роста на критических стадиях роста.

Пшенице необходим оптимальный температурный диапазон для идеального роста и функционирования, и любое отклонение от него повлияет на нормальный процесс роста. Холодный стресс серьезно ограничивает физиологические и биохимические реакции в растительной клетке, что приводит к хлорозу листьев, увяданию и даже некрозу растительных клеток.

Когда растение подвергается холодовому стрессу, происходит несколько морфологических изменений; впоследствии рост корневых побегов ограничивается, а урожайность снижается. У озимых зерновых низкотемпературный стресс на фазе вегетации вызывает хлороз и увядание листьев и в конечном итоге приводит к некрозу и замедлению роста. Холодный стресс серьезно влияет на прорастание и формирование всходов, вызывает задержку прорастания, плохое появление всходов, снижение плотности растений и неравномерное формирование стебля у пшеницы. Озимая пшеница первоначально испытывает низкотемпературный стресс, когда начинается кушение и когда сайты ассимиляции фотосинтеза и поглощения питательных веществ находятся в стадии развития; ученые подвергали растения пшеницы стрессу замерзания (от 0 до -13°C) в контролируемой камере в течение 2 часов, разрушение морозом начинается при -3°C , а полное сгорание флаговых листьев и колосьев происходит при -7°C ; следовательно, наблюдалось существенное снижение урожайности зерна. Аналогичным образом, воздействие холода при соединении приводит к уменьшению размера листьев, площади листьев и снижению биомассы побегов и ограничивает конечный результат. Кроме того, применение стресса от замерзания (-8 и -9°C) на стадии удлинения стебля ограничивает расширение междоузлий, денатурирует колоски, уменьшает транспорт ассимилятов, ограничивает накопление сухого вещества и вызывает значительное снижение урожайности зерна.

Низкая температура также влияет на рост корней пшеницы, поскольку рост корней является экологически контролируемым параметром. Длина корня более чувствительна к неоптимальной температуре, чем сухой вес. Это приводит к значительному сокращению разветвления корней и площади поверхности корней; следовательно, нарушается нормальное усвоение воды и питательных веществ. Ограниченная площадь поверхности корней подавляет способность растения использовать водные и питательные ресурсы.

Воздействие как низких положительных, так и низких отрицательных температур вызывает усиление выработки активных форм кислорода в проростках пшеницы, которые в обычных условиях образуются лишь в небольших количествах. При этом небольшое повышение уровня АФК может выступать в качестве сигнала, для активации защитных механизмов, в то время как высокая их выработка приводит к изменению структуры ДНК, белков и липидов и гибели клеток.

В ходе проведенных опытов было обнаружено, что уже через 1 ч от начала воздействия стресса в виде низких положительных и низких отрицательных температур у проростков пшеницы повышается устойчивость к промораживанию. С увеличением уровня стресса, то есть повышение холодового воздействия, устойчивость проростков пшеницы возрастала.

Действие низкой положительной температуры (+4°C) вызывало активацию одного из ферментов антиоксидантной защиты – пролина. Активность данного фермента возрастала при дальнейшем повышении стрессового воздействия низкими температурами. Пролин защищает белки от инактивации при обезвоживании, понижает водный потенциал клетки и тем самым предотвращает ее интенсивную дегидратацию, снижает температуру замерзания протопласта, защищает мембраны и макромолекулы от негативного воздействия активных форм кислорода, являются эффективными энергетическими субстратами.

При изучении влияния низких положительных и низких отрицательных температур на проростки озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Мос-

ковская 39, помимо пролина, мы остановились на изучении активности пероксидазы и полифенолоксидазы. В нашу задачу входило изучить изменения активности этих ферментов в зависимости от уровня стресса, вызываемого действием пониженных температур.

Опыты проводили с проростками озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39, выращенными в чашках Петри при комнатной температуре (+24°C). В недельном возрасте проростки подвергали воздействию низких положительных температур +4°C и низких отрицательных температур -6°, при прочих равных условиях. Выбор температуры закалки и ее продолжительности основывался на результатах предыдущих исследований [40]. Растения контрольного варианта оставались при +24°C. Все измерения проводили на первом листе проростков пшеницы.

1. Стрессовые условия, вызванные низкими положительными температурами (+4°C), вызвали повышение активности пролина на 18% по сравнению с контролем. Низкие отрицательные температуры вызвали повышение активности пролина на 38%, что свидетельствует о том, что воздействие стресса на проростки пшеницы увеличилось. Исходя из этого, можно предположить, что механизмы защиты, формирующиеся в ходе акклимации у проростков пшеницы, включают перераспределение доли связанной и свободной воды с одновременным повышением содержания пролина.

2. Применение низких положительных температур приводило к повышению активности пероксидаз на 15,5% по сравнению с контролем, при воздействии же низких отрицательных температур активность пероксидаз возросла на 76%. Под влиянием низких температур в проростках пшеницы повышается активность ферментов, данный факт многие авторы связывают с важной ролью пероксидаз в анаэробном дыхании озимых культур в зимнее время [25].

3. При воздействии стрессора в виде низких положительных и низких отрицательных температур, активность полифенолоксидазы по сравнению с контролем повышается на 52% и 80% соответственно. По мнению ряда ав-

торов, повышение экспрессии генов полифенолоксидазы при действии стрессовых факторов, напрямую связано с устойчивостью растений. При возникновении стресса активность полифенолоксидазы возрастает, при этом происходит формирование химических барьеров, которые препятствуют дальнейшему распространению активных форм кислорода.

Таким образом, действие стресса в виде низких температур повышает активность пероксидазы и полифенолоксидазы, которые являются полифункциональными ферментами, участвующими, как в утилизации, так и в генерации активных форм кислорода, возникающих, в большом количестве, при окислительном стрессе. На основании анализа литературы, одним из важных защитных эффектов при действии низкотемпературного стресса является накопление свободного пролина в клетках, что повышает устойчивость растений к абиотическим факторам. Весьма интересным и актуальным является дальнейшее изучение влияния низких положительных и низких отрицательных температур на рост, развитие и физиолого-биохимические процессы проростков пшеницы, а также выяснение механизмов защиты от данных неблагоприятных условий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алехина Н.Д., Балнокин Ю.В., Гавриленко В.Ф. и др. Физиология растений: учебник для студ., вузов. М.: Изд. центр «Академия», 2005. 640 с.
2. Альтерготт В.Ф. Действие повышенной температуры на растение в эксперименте и природе // 40-е Тимирязевское чтение. М.: Наука, 1981. 57 с.
3. Байрамбеков А.А. Влияние обработки регулятора роста циркон на урожайность различных культур // Естественные науки. 2009. Т.29. №4. С. 137-142.
4. Барабой В.А., Брехман И.И., Голотин В. Г. Перекисное окисление и стресс. СПб.: Наука, 1992. 148 с.
5. Болдырев М.И. Действие стрессовых факторов на растения // Журнал Защита и карантин растений. 2008. №4. С. 14-15.
6. Вахитов В.А. Способ повышения урожайности сельскохозяйственных растений // Агрономия и лесное хозяйство 1997. Т.45. №2. С.30-32.
7. Веселова Т.В. Стресс у растений (Биофизический подход). Биохимия, 1993. С. 144.
8. Воскресенская О.Л., Половникова М.Г. Изменение активности окислительно-восстановительных ферментов в процессе онтогенеза травянистых растений // Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2008. №1. С. 96-102.
9. Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений. – М: Высшая школа, 1975. – 392 с.
10. Генкель П.А. Физиология жаро- и засухоустойчивости растений. М.: Наука, 1982. 280 с.
11. Гуськов, Е.Н. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при оксидативном стрессе // Успехи современной биологии. 1993. Т.113. В.4. С. 456-470.
12. Дроздов С.Н., Будыкина З.Ф., Курец В.К. Экологофизиологические аспекты устойчивости растений к заморозкам // Л.: Наука. 1977. 228 с.

13. Егоров Ц. А. Защитные пептиды иммунитета растений // Биоорганическая химия. 2012. Т.38. №1. С. 7-17.
14. Жолкевич В.Н., Зубкова Н.К., Маевская С.Н., Волков В.С., Ракитин В.Ю., Кузнецов Вл.В. Взаимодействие теплового шока и водного стресса у растений. / Физиология растений. 1997. Т. 44. С. 613-623.
15. Жученко А.А. Адаптивная система селекции растений (экологогенетические основы). М.: Изд-во РУДН, 2001. 780 с.
16. Зайцев В.В. Элементарная математика. Под ред. В.В. Рыжова. М: Наука, 1973. – 591 с.
17. Карасев В.Н. Физиология растений. Йошкар-Ола, 2001. 272 с.
18. Климов, С.В. Пути адаптации растений к низким температурам / С.В. Климов Успехи соврем. Биологии, 2001. Т.121. №1. С.3-22.
19. Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е. Ответ растений на гипертермию: молекулярно-клеточные аспекты// Вестник Харьковского национального аграрного университета. Серия: Биология. 2009. Вып.1 (16). С. 16-38.
20. Колупаев Ю.Е. Активные формы кислорода в растениях при действии стрессоров: образование и возможные функции // Вестник Харьковского Национального Аграрного Университета. 2007. Т.3. №12. С.6- 26.
21. Кузнецов В.В. Общие системы устойчивости и трансдукции стрессорного сигнала при адаптации растений к абиотическим факторам // Вестник Нижегородского университета имени Лобачевского. 2001. С.64-68.
22. Кузнецов Вл.В., Шевякова Н.И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция / Физиология растений, 1999. Т. 46. С. 321-336.
23. Кулаева О.Н., Микулович Т.П., Хохлова В.А. Стрессовые белки растений// Современные проблемы биохимии. М.: Наука, 1991. С. 174-190.
24. Кулаева О.Н. Белки теплового шока и устойчивость растений к стрессу// Соросовский образовательный журнал. 1997. № 2. С. 5-13.
25. Кунаев Р.М. Гидролитические и окислительные ферменты обмена фенольных соединений растений. Алма-Ата: Наука, 1986. 160 с.

26. Кузнецов Вл.В., Шевякова Н.И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция// Физиология растений. 1999. Т. 46, № 2. С. 321-336.
27. Кузнецов Вл.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений: учебник. М.: Высш. шк., 2006. 742 с.
28. Косулина Л.Г., Луценко Э.К., Аксенова В.А. Физиология устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды. Ростов н/Д.: Изд-во Рост. унта, 1993. 238 с.
29. Клышев Л.К. и др. Биохимические механизмы интоксикации растений при засолении среды. Алма-Ата: Наука, 1980. 171 с.
30. Лось Д.А. Молекулярные механизмы холодоустойчивости растений// Вестник Российской академии наук. 2005. Т. 75, № 4. С. 338-345.
31. 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.
32. Медведев С.С. Физиология растений: учебник. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2004. 336 с. 13. Практикум по физиологии растений. М.: Колос, 1982. 271 с.
33. Мокроносов А.Т. Малый практикум по физиологии растений. М.: Изд-во МГУ, 1994. 184 с.
34. Полевой В.В. Внутриклеточные и межклеточные системы регуляции у растений// Соросовский образовательный журнал. 1997. № 9. С. 6-11.
35. Регуляция адаптивных реакций растений. Казань: Изд-во Казан. унта, 1990. 126 с.
36. Рекославская Н.И. Адаптационные изменения в белковом и аминокислотном обмене у растений в условиях водного стресса// Стрессовые белки растений. Новосибирск: Наука, 1989. С. 113-142.
37. Селье Г. На уровне целого организма. М.: Наука, 1972. 121 с.
38. Скулачев В.П. Возможная роль активных форм кислорода в защите

от вирусных инфекций // Биохимия. 1998. Т.63. С. 1691-1694.

39. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука, 2002. 294 с.

40. Титов А.Ф., Акимова Т.В., Таланова В.В. Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур. М.: Наука, 2006. 143 с.

41. Туманов И.И. Физиология закаливания и морозостойкости растений. М.: Наука, 1979. 350 с.

42. Тарчевский И.А. Катаболизм и стресс у растений // 52-е Тимирязевское чтение. М.: Наука, 1993. 80 с.

43. Тарчевский И.А. Метаболизм растений при стрессе. Казань: Фэн, 2001. 448с.

44. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука, 2002. 294 с.

45. Титов А.Ф., Акимова Т.В., Таланова В.В., Топчиева Л.В. Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур. М.: Наука, 2006. 143 с.

46. Трунова Т.И. Растение и низкотемпературный стресс// 64-е Тимирязевское чтение. М.: Наука, 2007. 54 с.

47. Удовенко Г.В. Солеустойчивость культурных растений. Л: Колос, 1977. 215 с.

48. Удовенко Г.В. Устойчивость растений к абиотическим стрессам// Физиологические основы селекции. Теоретические основы селекции. СПб.: Изд-во ВИР. 1995. Т. 2, ч. 1. С. 293-352.

49. Чиркова Т. В. Физиологические основы устойчивости растений. СПб: Изд-во СПб ун-та, 2002. 244с.

50. Чудинова Л.А., Орлова Н.В. Физиология устойчивости растений: учеб. Пособие / Перм. ун-т. Пермь, 2006. 124 с.

51. Чудинова Л.А., Филатова Л.А. Физиология устойчивости растений к экстремальным факторам: метод. указ. к лабораторным работам / Перм.

унт. Пермь, 1991. 24 с.

52. Физиология растений: учебник для студ. вузов. Под ред. И.П. Ермакова. М.: Издательский центр «Академия», 2005.

53. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа: Гилем, 2001. 160 с.

54. Шевякова Н.И. Метаболизм и физиологическая роль пролина при водном и солевом стрессе / Физиология растений, 1983. Т. 30. С.768-783

55. Шмидт В.М. Математические методы в ботанике: Учеб. пособие. Л: издательство ЛГУ, 1984. 288 с.