

ТРОФИМОВА ОКСАНА ИГОРЕВНА

Участие гликозидаз клеточной стенки в формировании низкотемпературной устойчивости озимых злаков

03.00.12 - физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань 2007

Работа выполнена в лаборатории механизмов роста растительных клеток Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Заботин Алексей Иванович
(КИББ КазНЦ РАН, г. Казань)

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Чиков Владимир Иванович
(КИББ КазНЦ РАН, г. Казань)

доктор биологических наук, профессор
Шакирова Фарида Миннихановна
(институт биохимии и генетики, УНЦ РАН, г. Уфа)

Ведущая организация: Казанский Государственный Университет
им. В.И. Ульянова-Ленина

Защита состоится «___» _____ 2007 г. в ____ час. на заседании диссертационного совета К 002.005.01 по присуждению ученой степени кандидата биологических наук при Казанском институте биохимии и биофизики КазНЦ РАН по адресу 420111 Казань, ул. Лобачевского 2/31, а/я – 30.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной библиотеке Казанского научного центра РАН

Автореферат разослан «___» _____ 2007 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

А.Б. Иванова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В формировании низкотемпературной устойчивости в процессе осенней закалки принимают участие все клеточные компартменты. События, имеющие место на уровне протопласта в ходе термоиндуцированных изменений клетки, в целом, хорошо охарактеризованы. При этом, представления о процессах, происходящих в клеточной стенке под действием низких температур, а также ее роли в низкотемпературной устойчивости ещё только формируются. Будучи многокомпонентной системой, клеточная стенка участвует в росте и развитии клеток и вовлекается в такие процессы, как устойчивость к различным неблагоприятным воздействиям среды (Tabuchi, Matsumoto, 2001; Piro et al., 2003). Являясь динамичным клеточным компартментом, клеточная стенка непрерывно претерпевает значительные изменения состава и структуры. Неизбежно образуемые при этом фрагменты полисахаридов вовлечены в регуляцию процессов жизнедеятельности растений. Так, например, хорошо известно, что олигосахаридные продукты являются активными элиситорами защитных реакций при патогенной инфекции (Albersheim et al., 1983). Выделенные эндогенные в последнее десятилетие олигосахариды, повышающие морозостойкость растений, открывают новый этап в развитии представлений о механизмах формирования адаптационных процессов (Заботина и др., 1998, 2003).

Одним из основных аргументов для формирования представлений о клеточной стенке, как о динамичной структуре, является присутствие в ней большого спектра ферментов. Среди них наиболее распространён класс гидролаз, к которому относятся гликозидазы. Показано, что они участвуют в модификации клеточной стенки в процессе роста клеток, созревания плодов (Masuda et al., 1985, Ranwala et al., 1992), а также в защитных реакциях растений в ответ на действие патогенов (Seo et al., 1995). Эти ферменты вовлечены также в процессы модификации полисахаридов клеточной стенки в ходе низкотемпературной адаптации (Заботин и др., 1998), что представляет для нас наибольший интерес. Особого внимания заслуживает участие гликозидаз в катаболических реакциях, исследование которых актуально как с точки зрения их роли в образовании регуляторных молекул (Тарчевский, 2001), так и особенностей формирования морозостойкости растительного организма.

Цель и задачи исследования. Целью работы является характеристика вовлеченности гликозидаз клеточной стенки в формирование морозостойкого состояния растений.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Провести сравнительное исследование активности гликозидаз проростков различных по устойчивости сортов пшеницы и ржи при формировании низкотемпературной устойчивости.
2. Оценить влияние олигосахаридной фракции, индуцирующей морозостойкость, на активность гликозидаз клеточной стенки проростков озимой пшеницы.

3. Оценить влияние АБК, инициирующей морозостойкость, на активность гликозидаз клеточной стенки проростков озимой пшеницы.

4. Охарактеризовать некоторые особенности формирования морозостойкости клеток при действии АБК в модельной системе - суспензионной культуре озимой пшеницы *Triticum timopheevii* Zhuk.

Научная новизна работы. Показано, что повышение активности гликозидаз является частью процесса адаптации озимых злаков. Впервые обнаружено влияние олигосахарина НТ, индуцирующего морозостойкость, на активность гликозидаз. Установлено, что реакция ферментов на действие температуры и олигосахарина НТ характерна только для озимых растений и не является сорто- и видоспецифичной. Впервые выявлена активация гликозидаз под действием АБК; показано, что этот процесс сопровождается изменением пропорции нецеллюлозных полисахаридов клеточной стенки. Использование частично синхронизированной суспензионной культуры клеток озимой пшеницы позволило показать, что процесс инициации закаливания определяется долей воспринимающих (компетентных) сигнал АБК клеток.

Научно-практическая значимость работы. В работе получили развитие представления о регуляторных механизмах низкотемпературной адаптации и, в частности, процессов, происходящих на уровне клеточной стенки. Показано, что активация гликозидаз, как часть термоиндуцированных катаболических реакций включена в генетическую программу адаптации клеток. Она может быть физиологическим показателем закаливаемых растений. Расшифровка механизмов перестройки клеточной стенки в ходе низкотемпературной адаптации поможет изменять свойства растительных организмов на молекулярном уровне, что позволит создавать новые устойчивые сорта растений.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследование. Исследования автора являлись частью работ, проводимых по грантам РФФИ 00-04-48220, Фонда НИОКР РТ 03-3.9-234/2004. Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены на 8 международной конференции по клеточной стенке (Норвич, Великобритания, 1998); на XII конгрессе FEPPS (Будапешт, Венгрия, 2000); на международной конференции «Актуальные вопросы экологической физиологии растений в XXI веке», (Сыктывкар, 2001); на 9 международной конференции по клеточной стенке (Тулуза, Франция, 2001); на 6 Пущинской конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (2002); на III съезде биохимического общества (СПб, 2002); на 7 Пущинской конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (2003); на международной научной конференции «Новая геометрия природы» (Казань, 2003); на V съезде общества физиологов растений России и международной конференции «Физиология растений - основа фитобиотехнологии» (Пенза, 2003); на всероссийской конференции «Стрессовые белки растений» (Иркутск, 2004); на 10 международной конференции по клеточной стенке (Сорренто, Италия, 2004); на молодежных конференциях КИББ КазНЦ РАН (2003, 2004), на итоговых

конференциях КазНЦ РАН (Казань, 2004- 2007); II международном симпозиуме «Сигнальные системы клеток растений: роль в адаптации и иммунитете» (Казань, 2006).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 работ (из них 3 статьи в отечественной и зарубежной печати).

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 135 страницах машинописного текста, включает 23 рисунка и 4 таблицы, состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы (241 наименование, из них 56 на русском языке).

1. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Объектами исследования служили проростки пшеницы (*Triticum aestivum* L.) озимых сортов Казанская-84, Мироновская 808 и яровых сортов Артёмовка, Керба, проростки озимой ржи (*Secale cereale* L.) полученных из ВИРа (Всероссийского Института Растениеводства им. Вавилова) сортов Бурятская, Ситниковская, Мининская, Вятка-2, Саратовская-7, Dominant, Кунгс-2, Петкус местный, Таловская и суспензионная культура клеток озимой пшеницы *Triticum timopheevii* Zhuk. (РККК ВР, № 34), полученная в отделе биотехнологии ИФР РАН из каллуса незрелых зародышей пшеницы (Зоринянц и др., 1993). Клетки выращивали на среде Шенка-Хильдебрандта (Shenk, Hildebrandt, 1971). Период субкультивирования составлял 21 день, при плотности посева 10x5 клеток/мл.

Характеристика олигосахарина НТ. Используемая в работе высокоочищенная (индивидуальный пик при анализе методом ВЭАОХ (Dionex, США)) олигосахаридная фракция эндогенного происхождения выделена из корней закаливающих проростков озимой пшеницы (через 6 часов действия температуры) согласно методике, описанной в работах Заботиной и др. (1998, 2003). Она на 90% состоит из глюкозы и ксилозы в соотношении 1:1, содержит в минорных количествах арабинозу и галактозу, имеет степень полимеризации 12, представляет собой, наиболее вероятно, фрагмент ксилоглюкана и обозначена в работе как олигосахарин НТ.

Приготовление белковых экстрактов. За основу выделения клеточных стенок и экстракции связанных с ней белков взята методика Ranwala et al. (1992), с модификациями. Кончики (2 см) корней проростков растирали в ступке, погруженной в лед, в буфере (20 мМ HEPES ("Sigma", США), 5 мМ Na₂S₂O₅, pH 7,5) в отношении 1:4 г/мл. Полученный гомогенат представлял растворимую фракцию. Клеточные стенки суспендировали в среде гомогенизации с добавлением 2М NaCl. Солевую экстракцию проводили в течение 24 часов при 4 °С. Навеску клеток помещали в тот же буфер 20 мМ HEPES ("Sigma", США) в соотношении 1:10. Для разрушения клеточных стенок клетки озвучивали на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-1 (Россия), при частоте 22 кГц, 0,5 А, два раза по 2 минуты. Гомогенат фильтровали, получая, растворимую белковую фракцию.

Определение гликозидазной активности. Ферментативную активность гликозидаз измеряли по модифицированной методике Masuda et al. (1988), с использованием в качестве субстратов 4-метилумбеллиферил меченые сахара (4-MU-гликозиды), ("Sigma", США). Концентрация каждого субстрата в реакционной смеси была: для 4-MU- β -D-галактозида – 75 мкМ, 4-MU- β -D-глюкозида – 500 мкМ, 4-MU- α -L-арабинозида - 75 мкМ, 4-MU- β -D-маннозида - 75 мкМ, 4-MU- β -D-фукозида – 25 мкМ. О величине ферментативной активности судили по количеству отщепившегося 4-метилумбеллиферона, содержание которого измеряли на спектрофлюориметре MPF-44B (Perkin Elmer, США) при длине волны 448 нм (длина волны возбуждения 325 нм). Активность фермента выражали в нМ 4-метилумбеллиферона, умножая на коэффициент (2,3), рассчитанный из калибровочной кривой для 4-метилумбеллиферона (натриевая соль) и относили к единице сырого веса (мг) за единицу времени (мин), или в процентах к исходному значению контрольных образцов.

Выделение фракций полисахаридов. Корешки проростков (2 см), фиксировали в термостате при 100⁰С в течение 30 мин, затем сушили при 60⁰С до постоянного веса. Для выделения клеточной стенки 100 мг сухого растительного материала растирали в фарфоровой ступке. К растертой до гомогенного состояния массе добавляли 5 мл фосфатного буфера (рН 7.0) и центрифугировали при 10000 об/мин 15 мин. Осадок промывали три раза 80 % ацетоном, и центрифугировали при том же режиме. Высушенные при комнатной температуре клеточные стенки гомогенизировали с 5 мл NH₄ оксалатного буфера (рН 5.2) с добавлением 0,05 М ЭДТА. Полученный гомогенат выдерживали 1 ч на водяной бане при температуре 80⁰С и затем центрифугировали при 10000 об/мин 15 мин. Осадок ещё раз ресуспендировали в том же буфере и повторяли ту же операцию. Полученная надосадочная жидкость представляла собой пектиновую фракцию клеточной стенки. Затем к осадку добавляли 5 мл 0,05М КОН с 0.01% боргидридом натрия и оставляли на 24 часа при комнатной температуре, затем центрифугировали 15 мин при 10000 об/мин, после чего собирали надосадочную жидкость. Таким образом, была получена 0,05М КОН фракция гемицеллюлоз. Последующие фракции гемицеллюлоз были получены таким же образом, путём последовательной экстракции 1М КОН и 4М КОН.

Определение каллозы проводили по методике (Kauss et al., 1983).

Определение содержания сахаров проводили антронным методом (Северин, Соловьев, 1989).

Измерение морозостойкости. Об изменении морозостойкости судили по выходу электролитов после промораживания образцов согласно модифицированной методике (Uemura, Steponkus, 1989). В опытах с проростками, листья каждого варианта (1 г) помещали в микрохолодильник типа ТЛМ и выдерживали в течение часа при температурах от -2⁰С до -16⁰С с интервалом в 2⁰С, отбирая через каждый час замороженные пробы. Клетки (0,1 г) суспензионной культуры отмывали 3% раствором сахарозы, помещали в микрохолодильник и выдерживали 1 ч при температурах от -3⁰С до -10⁰С, с

интервалом 1°C , отбирая через каждый час замороженные пробы. Затем к образцам листьев и клеток добавляли 10 мл дистиллированной воды и инкубировали на качалке 1 ч. Выход электролитов определяли по электропроводности жидкой фазы на кондуктометре ОК-102-1 с диаметром ячейки 22 мм и высотой 1,97 мм. Полумаксимальные значения электропроводности определяли как ЛТ_{50} – значение температуры, соответствующее 50% гибели клеток. За нулевой уровень принимали значение электропроводности образцов, не подвергавшихся промораживанию, за 100% - значения после автоклавирования образцов при 0,8 атм. 30 мин.

Определение митотического индекса клеток суспензионной культуры озимой пшеницы. Клетки помещали в фиксатор Кларка на 24 часа. Для мацерации использовался фермент: смесь гликозилаз из *Trichoderma viridae* (Maxazime С. Gist Brocades, Нидерланды). Мацерацию проводили при 40°C , 3 часа. Клетки окрашивали 1,5% орсеином. Готовили препараты типа “раздавленной капли” (Турков и др., 1988). На каждом препарате просмотрено не менее 2500 клеток.

Опыты проводили в 3 биологических и 3 аналитических повторностях. Данные обработаны статистически (Лакин, 1980). Анализ корреляционных связей определялся с использованием пакета программ "Анализ данных Excel XP". На графиках и в таблицах представлены средние арифметические величины со среднеквадратичной ошибкой.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Влияние низкой положительной температуры на активность гликозидаз и устойчивость проростков разных сортов пшеницы и ржи

Реакция внеклеточного матрикса проростков озимой пшеницы в ходе низкотемпературной адаптации характеризуется изменением моносахаридного состава основ-

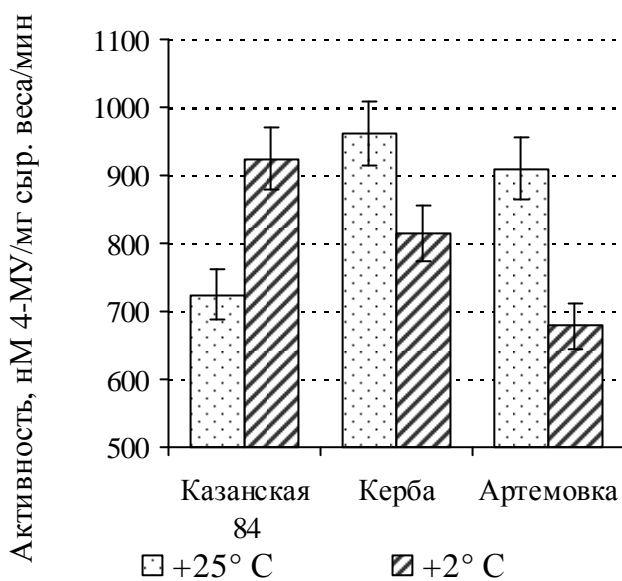


Рис. 1. Влияние краткосрочного воздействия низкой температуры ($+2^{\circ}\text{C}$, 4 часа) на активность глюкозидазы растворимой фракции проростков разных сортов пшеницы.

ных фракций полисахаридов (Заботин и др., 1995). Одной из причин этого может быть активация катаболизма полисахаридов. Действительно, ранее была обнаружена активация ряда гликозидаз клеточной стенки проростков озимой пшеницы в первые часы действия низкой положительной температуры ($+2^{\circ}\text{C}$); при этом пик активности гликозидаз предшествовал уменьшению содержания полисахаридных фракций (Заботин и др., 1998). Эти работы послужили предпосылкой для выяснения вопроса, связано ли формирование морозостойкости растений с реакцией активации гликозидаз.

Для ответа на этот вопрос, была проанализирована активность гликозидаз на начальном этапе закаливания у разных сор-

тов пшеницы и ржи. Базовая устойчивость этих сортов и уровень их морозостойкости были протестированы путём определения их ЛТ₅₀ при комнатной температуре (+25⁰С) и после воздействия низкой положительной температуры (+2⁰С) в течение 7 суток (табл.1).

Были использованы три сорта пшениц - яровые Артемовка и Керба, и озимая Казанская-84, на которой ранее был установлен факт активации гидролаз. Поскольку на температурное воздействие все исследованные гликозидазы (α -арабинозидаза, β -

Табл. 1. Характеристика базовой морозостойкости и способности к закаливанию (по ЛТ₅₀) проростков разных сортов пшеницы и ржи у незакалённых (+25⁰С, 7 суток) и закалённых (+2⁰С, 7 суток) растений. ***-Высокоустойчивые, **-среднеустойчивые, *- слабоустойчивые сорта ржи. Разница между значениями достоверна (P<0,05).

Сорт	Морозостойкость, ⁰ С	
	+25 ⁰ С	+2 ⁰ С
Пшеница яровая		
Керба	-4,7 ± 0,2	-5,3 ± 0,0
Артемовка	-5,0 ± 0,2	-5,4 ± 0,2
Пшеница озимая		
Казанская 84	-5,6 ± 0,2	-9,2 ± 0,1
Мироновская 808	-5,9±0,1	-9,6±0,1
Рожь озимая		
***Бурятская	-8,3 ± 0,1	-14,5 ± 0,4
***Ситниковская	-8,1 ± 0,2	-13,8 ± 0,4
***Мининская	-8,0 ± 0,0	-13,9 ± 0,0
**Вятка 2	-7,8 ± 0,1	-13,0 ± 0,5
**Dominant	-7,6 ± 0,2	-13,0 ± 0,0
*Кунгс 2	-7,3 ± 0,0	-12,4±0,2
*Саратовская 7	-7,1 ± 0,1	-12,1 ± 0,4
*Петкус местный	-7,0 ± 0,4	-12,0 ± 0,2
*Таловская	-7,0 ± 0,0	-11,8 ± 0,3

Следует отметить, что представленные озимые сорта ржи, полученные из коллекции ВИРа, охватывают все климатические зоны культивирования Российской Федерации. На основании наших исследований (табл.1), исходя из базовой ЛТ₅₀, они могут быть условно подразделены на сильно-, средне- и слабоморозостойкие.

Была исследована активность ферментов в различных по устойчивости сортах ржи: высокоустойчивых (Бурятская и Мининская), среднеустойчивых (Вятка-2 и Dominant), и менее устойчивом сорте (Петкус). Было показано, что стабильно наблю-

глюкозидаза, β -галактозидаза, β -маннозидаза, β -фукозидаза) реагировали сходным образом, в работе представлены данные по двум ферментам – глюкозидазе и галактозидазе. Как следует из экспериментов, 4-х часовая обработка проростков пшеницы низкой положительной температурой приводит к увеличению активности β -глюкозидазы (рис. 1) и β -галактозидазы (данные в реферате не приводятся) растворимой фракции морозостойкого сорта и ингибированию этих гликозидаз у яровых сортов. То есть, в яровых культурах отсутствует активация гликозидаз клеточной стенки, характерная для озимых культур.

Далее было выявлено наличие активации гликозидаз у сортов озимой ржи.

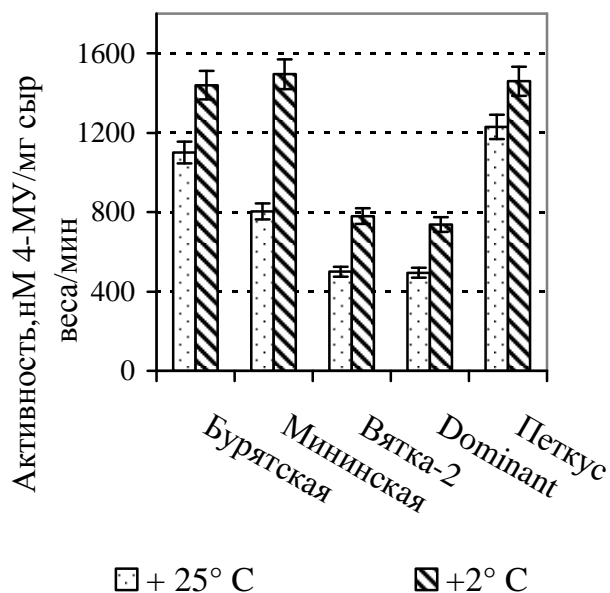


Рис. 2. Влияние краткосрочного воздействия низкой температуры ($+2^{\circ}\text{C}$, 4 часа) на активность глюкозидазы растворимой фракции проростков разных сортов озимой ржи.

даемая в озимой пшенице активация глюкозидазы и галактозидазы (данные в реферате не приводятся) через 4 часа действия низкой положительной температуры обнаруживается и во всех исследованных сортах озимой ржи, независимо от степени их устойчивости (рис.2).

Более детальное исследование влияния низкой положительной температуры на активность ферментов подтвердило наши выводы о сходстве реакции гликозидаз в озимых сортах пшеницы и ржи. Так исследования на примере сортов Бурятская и Ситниковская (данные в реферате не приводятся) показали наличие термоиндуцированного повышения активности β -глюкозидазы, β -галактозидазы, β -маннозидазы, β -фукозидазы, которое наблюдается и в проростках озимой пшеницы (Заботин и др., 1998). Положительной корреляции между степенью активации гликозидаз и уровнем морозостойчивости не обнаружено.

Таким образом, суммируя данные по реакции гликозидаз клеточной стенки на действие низкой положительной температуры, и сопоставляя их с данными по измерению морозостойчивости, можно заключить, что, изменение активности гликозидаз и способность к закаливанию совпадают, что, по-видимому, является частью программы адаптивной реакции клеток озимых растений.

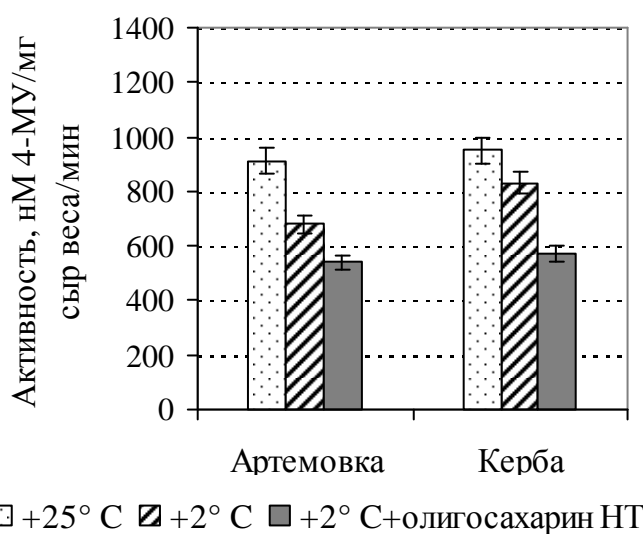


Рис. 3. Влияние олигосахарина НТ на активность глюкозидазы растворимой фракции проростков яровых пшениц. Олигосахарин НТ (0,05 мкг/мл) вносили в среду выращивания за 16 часов до гипотермии ($+2^{\circ}\text{C}$, 4 часа).

2.2. Влияние высокоочищенной олигосахаридной фракции, индуцирующей морозостойкость, на активность гликозидаз яровой пшеницы и озимой ржи

Рядом исследователей показано усиление гидролитической активности ферментов при различных приспособительных реакциях, в том числе и на холодовую обработку (Вовчук и др., 1994), что позволило сделать заключение о вовлеченности катаболических реакций в реорганизацию и обновление структуры и состава клетки (Браун и др., 1987, Тарчевский, 2001).

Предполагается, что активация катаболизма может быть связана с образованием регуляторных молекул (Тарчевский, 2001). Действительно, из проростков озимой пшеницы была выделена олигосахаридная фракция, обозначенная олигосахарин НТ, которая образуется в первые часы адаптации под действием низкой положительной температуры (Заботина и др., 1998, 2003). Судя по моносахаридному составу, она происходит из фракции гемицеллюлоз. Было показано, что обработка проростков озимой пшеницы олигосахарин НТ, выделенным из этого же объекта, до начала закаливания повышала эффективность термоадаптации растений (Заботина и др., 1998, 2003).

Обработка олигосахарин НТ проростков озимой пшеницы за 16 часов до помещения их на закаливание приводила к усилению активации гликозидаз в начальный период адаптации (Трофимова и др., 2004). При этом у яровых пшениц сортов Артемовка и Керба такая предобработка усилила падение активности глюкозидазы (рис.3) и галактозидазы (данные в реферате не приводятся). Влияние олигосахарина НТ на морозостойкость проявлялось только у озимых сортов (табл. 2).

При использовании той же схемы воздействия олигосахарин НТ и температурой, была выяснена реакция гликозидаз у озимой ржи на внесение олигосахарина НТ, выделенного из пшеницы. Это, вместе с измерениями морозостойкости, позволило выяснить видовую специфичность эффектора. Олигосахарин НТ увеличивал морозостойкость во всех тестируемых сортах ржи (табл. 2). Предобработка “пшеничным” олигосахарин НТ так же повышала активность глюкозидазы озимой ржи трех сортов (по одному из каждой группы устойчивости: Мининская, Вятка-2, Петкус) (рис. 4). По-видимому, в процессе закаливания ржи образуются подобные биологически активные молекулы и, возможно, того же состава, по-

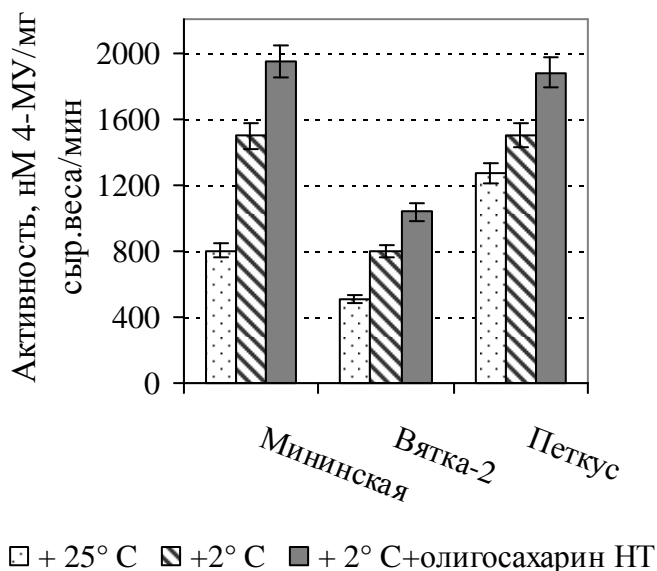


Рис. 4. Влияние олигосахарина НТ на активность глюкозидазы растворимой фракции проростков разных сортов озимой ржи.

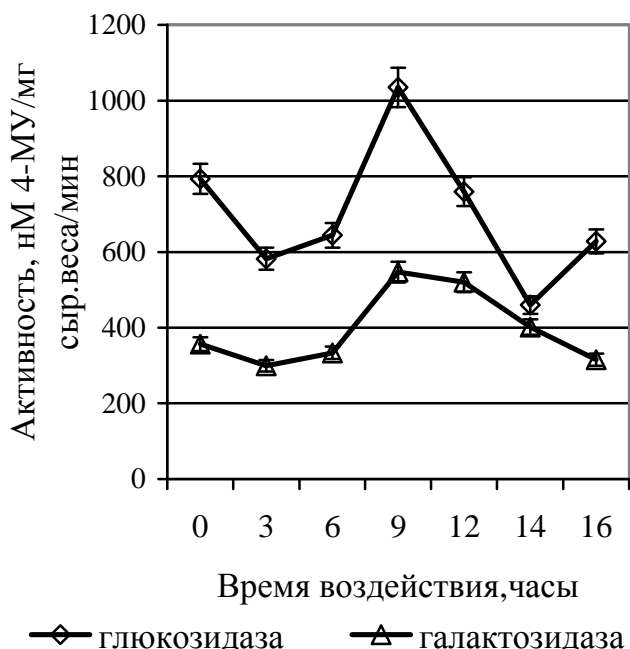


Рис. 5. Влияние олигосахарина НТ (0,05 мкг/мл) на активность глюкозидазы и галактозидазы растворимой фракции корней проростков озимой пшеницы Казанская 84 (25°С).

Табл. 2. Влияние закаливания и обработки олигосахаринном НТ на морозостойчивость проростков разных сортов пшеницы и ржи. Олигосахарин НТ (0,05 мкг/мл) вносили за 15 часов до гипотермии (+2°C, 7 суток). ***- Высокоустойчивые, **- среднеустойчивые, *- слабоустойчивые сорта озимой ржи. Разница между значениями достоверна (P<0,05).

Сорт	Морозостойкость, °С	
	2°C	Олигосахарин НТ + 2°C
Пшеница яровая		
Керба	-5,3 ± 0,0	-5,3 ± 0,1
Артемовка	-5,4 ± 0,2	-5,4 ± 0,1
Пшеница озимая		
Казанская 84	-9,2 ± 0,1	-10,8 ± 0,2
Мироновская 808	-9,6 ± 0,1	-11,1 ± 0,3
Рожь озимая		
***Бурятская	-14,5 ± 0,4	-15,8 ± 0,5
***Ситниковская	-13,8 ± 0,4	-15,0 ± 0,3
***Мининская	-13,9 ± 0,0	-15,2 ± 0,1
**Вятка 2	-13,0 ± 0,5	-14,3 ± 0,4
**Dominant	-13,0 ± 0,0	-14,2 ± 0,0
*Кунгс 2	-12,4 ± 0,2	-13,6 ± 0,2
*Саратовская 7	-12,1 ± 0,4	-13,0 ± 0,3
*Петкус местный	-12,0 ± 0,2	-13,3 ± 0,3
*Таловская	-11,8 ± 0,3	-12,8 ± 0,4

низких температур сохраняется и при обработке олигосахарином НТ, но эффект при его применении усиливается, что, в свою очередь, согласуется с его влиянием на морозостойкость разных сортов и видов злаковых (табл.2).

2.3. Изменение активности гликозидаз и содержания нецеллюлозных фракций полисахаридов клеточной стенки при действии АБК

Известно, что образование морозостойкого состояния растений, находящихся в условии комнатной температуры может быть индуцировано экзогенным добавлением фитогормона - абсцизовой кислоты (АБК) (Veisz et al., 1996). Вызываемые ею изменения метаболизма клетки касаются и механических свойств клеточной стенки, аналогично наблюдаемым при закаливании низкими положительными температурами (Ra-

скольку рожь и пшеница имеют сходный тип строения клеточной стенки (Carpita, 2000).

Олигосахарин НТ способен индуцировать морозостойкость озимой пшеницы и при комнатной температуре (Трофимова, Торощина, 2003). К тому же он активизирует и гликозидазы (рис. 5). Уже в первые 3-6 часов действия олигосахарина НТ при комнатной температуре наблюдается сначала небольшое снижение, а потом кратковременное повышение (к 9 часам) активности гликозидаз.

Таким образом, основные события в запуске процесса низкотемпературной перестройки под действием олигосахарина НТ происходят именно в первые часы воздействия, что обуславливает повышение устойчивости преобразованных проростков. Направленность реакции гликозидаз (активация или ингибирование) при воздействии

jashekar, Lafta, 1996). Существующая точка зрения, о том, что низкая температура и АБК могут иметь независимые пути трансдукции сигнала (Thomashow, 1999; Gusta et al., 2005), при одновременном сходстве ответной реакции на них, позволила сравнить влияние АБК и температуры на активности гликозидаз на начальных этапах формирования низкотемпературной адаптации.

Исследования показали, что как в растворимой (рис. 6, А), так и в ионно-связанной фракциях (рис. 6,Б), активация всех исследованных нами гликозидаз: α -арабинозидазы, β -галактозидазы, β -глюкозидазы, β -фукозидазы и β -маннозидазы наблюдалась, в основном, через 6-9 часов после действия гормона. Характерно, что как и в случае действия низкой положительной температуры, она продолжалась в течение суток.

Исходя из полученных данных реакции гликозидаз, мы предположили, что при действии АБК фракции матриксных полисахаридов клеточной стенки могут подвергаться модификации таким же образом, как и при действии температуры (Заботин и др., 1995).

Действительно, в ходе исследований было обнаружено, что обработка растений АБК приводила к изменениям в содержании полисахаридных фракций, что характеризовалось временным снижением количества пектинов и фракций гемицеллюлоз, экстрагируемых щелочью 0,05М, 1М и 4М в первые часы действия АБК (рис.7). Наиболее интересным представляется увеличение фракции гемицеллюлоз, экстрагируемых 4М щелочью через 24 часа действия гормона. Возможно, что модификация этой фракции может свидетельствовать об усилении прочности клеточной стенки.

При действии температуры активация гликозидаз как в растворимой, так и ионно-связанной фракциях предшествовала уменьшению количества полисахаридных фракций (Заботин и др., 1998).

При сравнении содержания матриксных полисахаридов и их синтеза с изменением гликозидазной активности, был сделан вывод, что уменьшение количества полиса-



Рис. 6. Динамика активности гликозидаз растворимой А), ионно-связанной Б) фракции из корней проростков озимой пшеницы при действии АБК (10 мкМ, 25⁰ С). За 100% принята активность гликозидаз без воздействия.

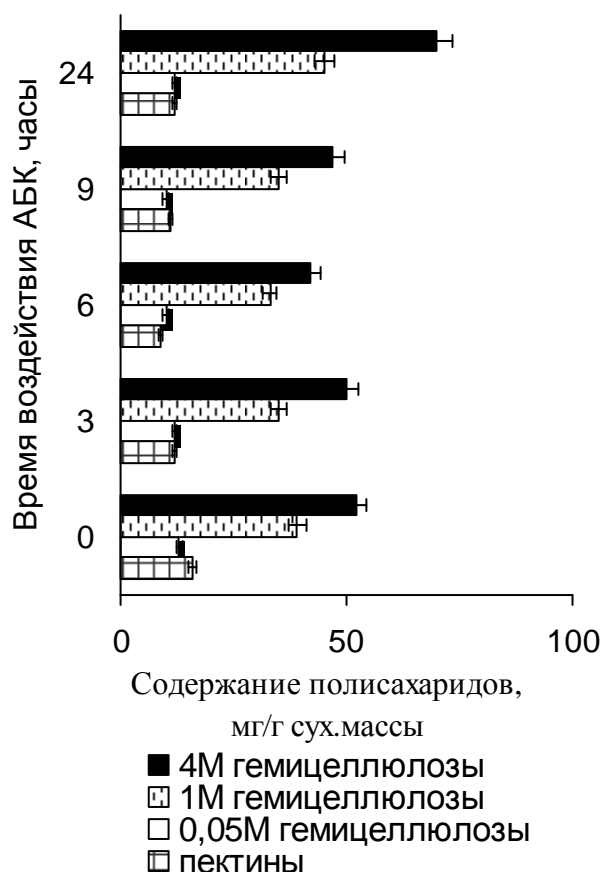


Рис. 7. Изменение содержания нецеллюлозных фракций полисахаридов корней проростков озимой пшеницы при воздействии АБК (10 мкМ, 25⁰ С).

Таким образом, индуцируемые АБК изменения клеточного метаболизма, вызывающие повышение морозостойчивости, приводят к перестройке метаболизма клеточной стенки так же, как это происходит при действии низкой температуры.

2.4. Действие циклогексимида на индуцированное АБК изменение активности гликозидаз корней проростков озимой пшеницы

Использование ингибиторов трансляции и транскрипции позволило сформировать современные представления о роли белоксинтезирующей системы в формировании морозостойкого состояния растений. Известно, что циклогексимид (ЦГ) препятствует образованию морозостойкого состояния (Зверева, Трунова, 1985; Новицкая и др., 1995). Повышение устойчивости к низким температурам с помощью обработки АБК как при нормальной, так и при температуре закаливания, реализуется посредством дифференциальной экспрессии генов, что приводит к изменениям в синтезе белка (Mohapatra et al., 1988; Xin, Li, 1992). Между тем, имеются данные, что морозостойкость, индуцируемая гормоном при физиологически нормальной температуре не подавляется ингибиторами белкового синтеза (Таланова и др., 1988). Результаты проведенных нами ранее экспериментов показали, что ЦГ, добавленный одновременно с АБК в среду

харидов является результатом как снижения их образования, так и увеличения их деградации (Zabotin et al., 1998). Выявленные нами сходные изменения в содержании фракций и активации гликозидаз могут свидетельствовать об изменениях моносахаридного состава как при действии температуры, так и АБК. Анализ моносахаридного состава и типов связей показал, что при гипотермии наблюдается, главным образом, обмен гемицеллюлозной фракции (Zabotin et al., 1998). Предполагается, что активация катаболизма гемицеллюлоз в процессе их обновления приводит к появлению олигосахаридов – фрагментов полисахаридов, вовлеченных в процесс низкотемпературной адаптации (Заботина и др., 2003). Они могут образовываться в результате активной работы ферментов, локализованных в клеточной стенке и участвующих в гидролизе гликозильных связей матричных полисахаридов.

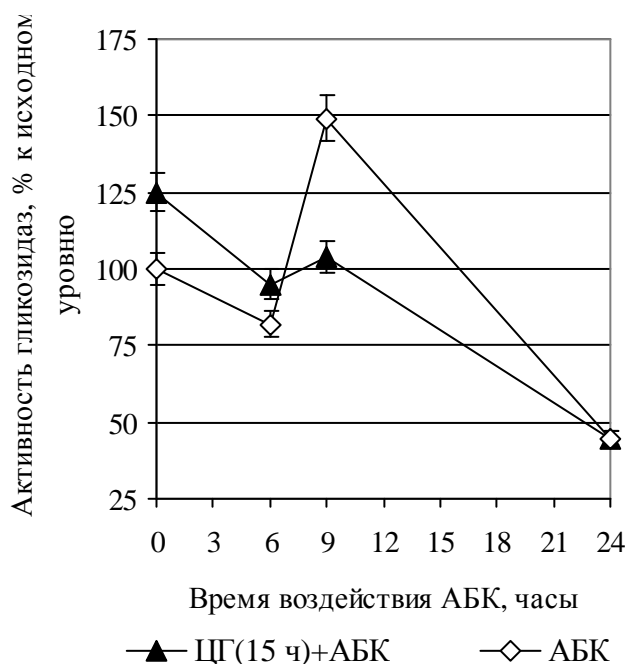


Рис. 8. Влияние предобработки ЦГ ($3 \cdot 10^{-5}$ М, 15 часов) на динамику активности гликозидазы растворимой фракции корней проростков озимой пшеницы при воздействии АБК (10 мкМ, 25° С). За 100% принята активность гликозидаз без воздействия.

культивирования суспензионных клеток озимой пшеницы, препятствовал образованию морозостойкого состояния (Трофимова, Заботин, 2001). Поскольку обнаружено, что АБК способна активировать гликозидазы, возник вопрос о вовлеченности белоксинтезирующего аппарата клетки в регуляцию этого процесса.

Исследуя влияние ЦГ на индуцируемую АБК активацию гликозидаз, было обнаружено, что обработка ЦГ за 15 часов до внесения АБК полностью снимает эффект гормона как в растворимой (рис. 8), так и в ионно-связанной (данные в реферате не приводятся) фракциях, на примере гликозидазы. Это свидетельствует о том, что регуляция активности этих ферментов сопряжена с функционированием белоксинтезирующей системы, и привело нас к выводу о сходстве механизмов регуляции

метаболизма клеточной стенки под действием гормона и под действием температурного фактора.

На корнях проростков озимой пшеницы было показано, что ЦГ полностью подавляет фазу активации гликозидаз клеточной стенки в первые часы закаливания низкой температурой (Барышева и др., 1999). Авторы предполагают, что подавление циклогексимидом термоиндуцированного адаптивного “всплеска” активности гликозидаз происходит через блокирование экспрессии генов, ответственных за образование регуляторных молекул, которые в норме ответственны за активацию гликозидаз клеточной стенки. В этой же работе был обнаружен интересный факт повышения активности гликозидаз за время предобработки этим ингибитором при комнатной температуре, что также наблюдается в наших экспериментах в обеих фракциях в момент внесения АБК.

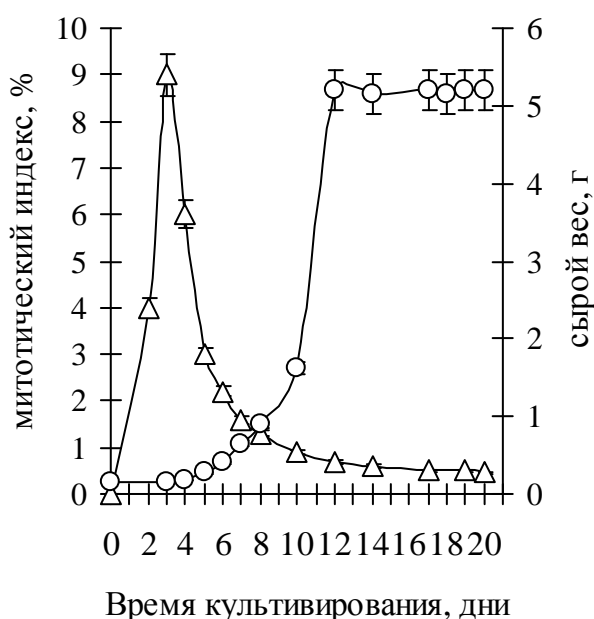
Исходя из полученных данных, пока сложно установить точный механизм, с помощью которого ингибитор активирует гликозидазы. Следует отметить, что как в случае индукции активности АБК (рис. 8), так и температурой (Барышева и др., 1999), ЦГ подавлял именно фазу активации ферментов.

2.5. Характеристика действия АБК на ростовые параметры и формирование морозостойкого состояния суспензионной культуры озимой пшеницы

Культуры растительных клеток широко используются в качестве модельных систем для проведения физиологических исследований. Их использование позволяет стро-

го контролировать и изменять условия роста и развития, а синхронизация роста клеток позволяет вести исследования с достаточно однородной популяцией. Ранее было обнаружено, что в первые часы закаливания частично синхронизированной суспензионной культуры озимой пшеницы *Triticum timopheevii* Zhuk. низкими положительными температурами активируются те же гликозидазы, что и у проростков озимой пшеницы (Барышева, Заботин, 2001). Поэтому, исследование АБК-индуцированного формирования морозоустойчивости клеток проводилось на суспензионной культуре озимой пшеницы.

На рисунке 9 представлен рост культуры клеток озимой пшеницы *Triticum timopheevii* Zhuk. (РККК ВР, № 34), оцениваемой по накоплению сырой массы. На графике



—△— митотический индекс —○— масса

Рис. 9. Изменение массы и митотического индекса в течение культивирования суспензионной культуры клеток озимой пшеницы *Triticum timopheevii* Zhuk.

можно выделить основные стадии ее развития: экспоненциальная фаза со 2 по 6 день, когда идёт интенсивное деление клеток без значительного увеличения массы клеток, фазу быстрого (логарифмического) роста (от 7 до 12 дней), когда клетки переходят к росту растяжением и стационарную фазу (от 12 до 21 дня), в течение которой не происходит каких-либо изменений в величине митотического индекса или в увеличении массы клеток.

Было показано, что в ходе развития суспензионной культуры озимой пшеницы максимальный митотический индекс предшествовал накоплению эндогенной каллозы (Заботин и др., 2002). Это позволило связать увеличение количества полисахарида с формированием клеточной пластинки в процессе деления клеток. Было показано, что деградация

каллозы в клетках, закончивших цитокинез, происходит на фоне клеток, переходящих к росту растяжением (Заботин и др., 2002). Таким образом, «время жизни» каллозы ограничено соответствующей стадией цитокинеза. Эти данные дают возможность заключить, что эндогенный уровень каллозы может использоваться как своего рода маркер пролиферативной активности клеток и прохождения ими стадии деления.

Было обнаружено, что кривая роста культуры меняется в зависимости от того, на какой фазе роста была внесена АБК. На рисунке 10, А представлены данные о том, что при внесении гормона в среду культивирования в начале пассажа (0 день) рост клеток полностью подавлялся, а при внесении гормона на стадии экспоненциального роста (на 3-й день) - на 35%. Подсчет митотического индекса показал (рис. 10, Б), что практически полное подавление роста при внесении АБК в самом начале пассажа сопровожда-

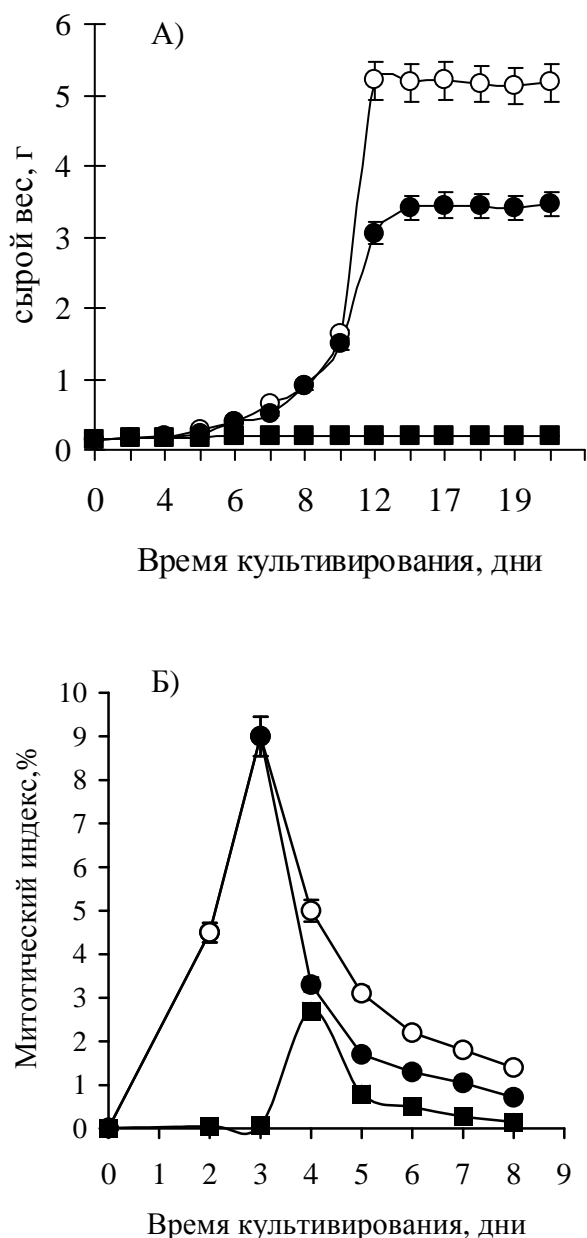


Рис. 10. Влияние АБК (50 мкМ, 25⁰ С) на рост А) и митотический индекс Б) суспензионной культуры озимой пшеницы *Triticum timopheevii* Zhuk. в зависимости от времени ее внесения. ○ - ростовая кривая без обработки, ■ - АБК внесена в начале пассажа, ● - АБК внесена на 3 день пассажа

ется падением митотического индекса и появлением его пика на сутки позже, чем в контроле.

Если АБК вносилась в момент максимального деления культуры, то митотический индекс снижался в меньшей степени. Исходя из данных по распределению делящихся клеток в ходе пассажа, видно, что степень подавления роста зависит от количества клеток, находящихся на той стадии клеточного цикла, когда они чувствительны к действию АБК. Молекулярные механизмы запуска клеточного деления и регуляция клеточного цикла при изменениях окружающей среды недостаточно изучены. Также немного известно о роли и механизмах действия АБК в клеточном цикле. Данные литературы предполагают, что механизм влияния АБК на клеточный цикл состоит в экспрессии ингибитора *cdc-2* киназы - *ICK1* (Wang et al., 1998), а также в запуске экспрессии *SK1A* гена, роль которого, возможно, связана с удлинением клеточного цикла растений под действием неблагоприятных факторов (Stals et al., 2000). Есть данные, свидетельствующие о том, что у АБК в клеточном цикле одна «точка приложения» - это момент перехода клеток из стадии G₁ в стадию S (den Boer, Murray, 2000; Stals, Inzй, 2001), когда индуцируемый АБК ингибитор *ICK1* способен «перепрограммировать» путь развития клеточного цикла, и, пройдя которую, клетки, по-видимому, не воспринимают АБК.

Поскольку нами было установлено, что параметры клеточной культуры: масса, митотический индекс меняются в ответ на АБК (рис. 12) в зависимости от времени её внесения, нас интересовало, как эти изменения согласуются с возникновением морозостойкости в культуре. Были проведены эксперименты по определению морозостойкого состояния клеток озимой пшеницы, индуцированного действием АБК при комнатной температуре. Так, если клетки подвергались действию гормона в самом начале пассажа, индукция морозостойкости наблюдалась к третьим суткам. Внесение АБК в среду

Табл. 3. Образование морозостойкого состояния клеток (по LT_{50}) суспензионной культуры озимой пшеницы *Triticum timopheevii* Zhuk. под действием АБК (50 мкМ, 25⁰С) в зависимости от возраста. * Время обработки 12 часов

Время культивирования, дни	Контроль	АБК внесена в начале пассажа	АБК внесена на 3 день
	LT_{50} в ⁰ С		
1	- 5,3 ± 0,3	- 5,3 ± 0,3	-
2	- 5,5 ± 0,3	- 5,5 ± 0,3	-
3	- 6,5 ± 0,2	- 7,4 ± 0,2	- 7,4 ± 0,2*
4	- 7,5 ± 0,2	- 8,2 ± 0,2	- 8,6 ± 0,2
5	- 8,1 ± 0,2	- 9,0 ± 0,2	- 9,5 ± 0,2

рою наблюдается при действии любых неблагоприятных факторов, приводит к торможению деления и роста клеток. То есть, не активный метаболизм клетки сам по себе является условием устойчивости. Возникновение морозостойкости, наблюдавшееся к третьим суткам, связано, как уже упоминалось выше, с появлением достаточного количества клеток, в той фазе клеточного цикла (G_1/S) (den Boer, Murray, 2000; Stals, Inzй, 2001), когда сигнал гормона эффективно воспринимался. Более быстрое формирование устойчивости связано с количеством проходящих по циклу клеток. В варианте с внесением АБК в самом начале пассажа отсутствие формирования морозостойкости в первые 2 суток может быть связано с изначально малым количеством клеток, вступающих в клеточный цикл.

Следует отметить, что измерение морозостойкости суспензионной культуры проводилось нами с использованием метода измерения электропроводности водной вытяжки замороженных клеток. Это позволило нам, используя более высокую разрешающую способность по температурной шкале, обнаружить очень узкий температурный интервал выживаемости клеток, выражающийся в скачкообразном переходе к максимальному выходу электролитов (свидетельство гибели клеток), тогда как для целых растений этот процесс имеет значительно более “плавный” и постепенный характер. Данная особенность при измерении электропроводности клеток суспензии свидетельствует о значительной однородности клеточной популяции, что дает нам основа-

роста клеток в момент их интенсивного деления значительно сокращало время возникновения морозостойкости – она обнаруживалась уже через 10 часов (табл. 3).

Устойчивость и способность клеток к закаливанию зависят от зоны роста органа в случае целых растений кукурузы (Родченко и др., 1988), или от возраста, в случае суспензионной культуры (Сопина и др., 1994). Есть мнение, что клетки, находящиеся на стадии активного деления, до перехода к растяжению и обладающие высокой метаболической активностью, проявляют наибольшую способность к адаптации (Сопина и др., 1994). Известно, что повышение уровня АБК, кото-

ние рассуждать о чувствительности клеток, проходящих определенную стадию своего развития.

По-видимому, эффективно закаливаться (приобретать устойчивость к какому-либо фактору) способны не все клетки растительной ткани, даже обладающие активным метаболизмом. Синхронизованная в достаточной степени культура клеток проходит во времени стадии своего развития, аналогичные определенным зонам роста целых растений, за исключением дифференциации. Представленные нами экспериментальные и литературные данные позволяют предположить, что закалку инициируют клетки, проходящие определенную стадию клеточного цикла. Но доля этих клеток невелика в относительно синхронных суспензионных культурах, а в целом растении еще меньше. Тем не менее, у растений наблюдается более высокая степень морозостойкости, чем в культурах. Можно предположить, что в воспринявших внешний сигнал клетках образуются интегрирующие факторы, которые могут распространяться от клетки к клетке и вовлекать в процесс образования морозостойкого состояния ткани в целом. Действительно, в литературе имеются сведения, указывающие на существование неких интегрирующих факторов (Sato et al., 1986; Ojima et al., 1997). Можно предположить, что определенную роль в передаче сигнала от клетки к клетке при образовании морозостойкого состояния могут играть олигосахарины НТ. Эти молекулы обладают определенными особенностями, которые позволяют им выполнять подобные функции: во-первых, их накопление обнаруживается уже через 3 часа воздействия низкой температуры в кончике корня, где доля меристематических клеток больше, тогда как в остальной части корня – через 6 часов или позже, и, во-вторых – они обнаруживаются в первые часы и при обработке растений АБК (Торощина, 2004) в-третьих, они имеют небольшую молекулярную массу (степень полимеризации 12). Кроме того, нами получены данные, предполагающие, что одной из функций олигосахарина НТ может быть усиление “сигнала” АБК. Так, предобработка этим веществом проростков озимой пшеницы в полумаксимальной концентрации приводила к значительному возрастанию эффекта АБК на их закалывание (табл. 4).

Как показали эксперименты, обработка проростков озимой пшеницы либо только олигосахаринами НТ, либо АБК, приводила к повышению морозостойкости примерно на 25%. Растения, обработанные сначала АБК, а через 15 часов олигосахаринами НТ, показали «суммирование» эффектов, равное теоретической сумме, то есть наблюдается аддитивное влияние того и другого вещества на их морозостойкость. Иное взаимодействие было выявлено при предобработке проростков озимой пшеницы олигосахаринами НТ в течение 15 часов до внесения фитогормона. При этом морозостойкость значительно превышала просто суммирование влияния того и другого вещества (табл. 4).

Так, уже через 3 часа предобработки олигосахаринами НТ эффективность закалки озимой пшеницы под действием АБК превысила простое сложение двух эффектов, то есть, наблюдался синергический характер взаимодействия, который к 9 часам действия олигосахарина НТ достиг максимального уровня (табл. 4). Из этих данных следует, что эффект олигосахарина НТ на закалывание зависит, во-первых, от порядка внесения эффектов, во-вторых, от продолжительности его воздействия. Таким образом, можно

Таблица 4. Влияние олигосахарина на морозостойкость (LT_{50} , %, 7 суток) проростков озимой пшеницы, индуцированную АБК (1 мкМ, 25⁰С, 7 суток). Олигосахарин НТ (0,025 мкг/мл, 25⁰С) добавляли на указанное время до или после начала действия фактора. За 100 % принято значение LT_{50} для незакаленных проростков озимой пшеницы (-5,6⁰С).

Время предобработки, ч	АБК	Олигосахарин НТ	Олигосахарин НТ + АБК	АБК + олигосахарин НТ
LT_{50} , %				
0	125 ±0,2	123 ±0,2	122 ±0,3	100
1	-	-	150 ±0,2	-
3	-	-	175 ±0,2	-
6	-	-	177 ±0,2	-
9	-	-	<u>200</u> ±0,2	-
12	-	-	<u>200</u> ±0,2	-
15	-	-	<u>200</u> ±0,2	<u>150</u> ±0,1

заклучить, что олигосахарин НТ не только сам может индуцировать процесс образования морозостойкого состояния, но также способен повышать эффективность действия АБК. Учитывая, что и тот, и другой эффектор эндогенного происхождения, можно предположить, что одной из физиологических задач олигосахарина НТ является увеличение чувствительности клеток растения к действию АБК. Таким образом, данный биологически активный сахар играет роль сенсibilизатора клеток к фитогормону, то есть, действительно является эндогенной регуляторной молекулой.

Как уже упоминалось выше, к действию абсцизовой кислоты клетки растения чувствительны ограниченный промежуток времени, и к тому же не все клетки тканей, а лишь определенное их количество. Поэтому, одной из возможных причин повышения уровня морозостойкости предобработанных олигосахарином НТ проростков является то, что олигосахарин НТ может изменять восприимчивость клеток к гормону. И наиболее вероятный механизм явления синергизма, по нашему мнению, связан с эффективностью рецепции сигнала АБК, детали которого еще предстоит выяснить.

Заклучение

Начальные этапы низкотемпературного закаливания растений характеризуются усилением катаболических реакций, одним из следствий которого является, по видимому, появление олигосахаридов – фрагментов полисахаридов клеточной стенки, которые вовлечены в процесс низкотемпературной адаптации. Основываясь на данных, представленных в этой работе, можно заклучить, что активация гликозидаз, как показатель усиления катаболических процессов, не только вовлечена в процессы модифи-

кации полисахаридных компонентов клеточной стенки, но и является составляющей адаптационной программы именно закаливающих растений. Это расширяет наши представления о роли гликозидаз клеточной стенки в растительном организме, поскольку ранее она обычно сводилась к процессам, связанным с ростом или созреванием плодов.

Интересными, на наш взгляд, являются данные, показывающие изменение активности гликозидаз в ответ на применение олигосахарина НТ, который появляется в первые часы действия низкой положительной температуры. Характерная особенность его влияния на активность гликозидаз - усиление их активации в способных к закаливанию сортах пшеницы и ржи, не только свидетельствует о роли олигосахарина НТ в адаптации, но и предполагает, что его происхождение и цепь вызываемых им процессов могут быть универсальными для озимых культур. Способность этого биологически активного сахара самостоятельно повышать морозостойкость растений ставят его в ряд таких эффекторов, как низкая температура и АБК. Поскольку, олигосахарин НТ является эндогенным, он может быть назван системным фактором, участвующим в формировании морозостойкости растений.

Учитывая, что олигосахарин НТ является продуктом усиления гидролитических процессов, инициируемых низкой температурой, можно заключить, что активация гликозидаз является не просто частью катаболических реакций, но и выявляет регуляторную роль этих процессов при закаливании растений. Таким образом, процессы, происходящие в клеточной стенке, являются неотъемлемой частью всего комплекса реакций, запускаемых при низкотемпературной адаптации растений.

Использование суспензионной культуры озимой пшеницы позволило выяснить особенности формирования морозостойкого состояния растений, в частности, под действием АБК, где выявлена первичная связь этого процесса не столько с активным метаболизмом клеток, сколько с чувствительностью клеток на определённой стадии прохождения ими клеточного цикла. Эти данные позволили предположить, что олигосахарин НТ является специфическим межклеточным эффектором, запускающим адаптивную программу клеток, не способных воспринять сигнал гормона непосредственно, то есть, способствовать закаливанию всего растительного организма.

Суммируя результаты представленной работы, можно составить следующую цепочку событий, происходящих в клеточной стенке в ходе закаливания растений (рис. 11): понижение температуры приводит к повышению уровня АБК, сигнал которой, воспринимаемый клетками, находящимися в определенной фазе клеточного цикла, запускает каскад внутриклеточных реакций, приводящих, в том числе, к активации гликозидаз клеточных стенок, которые принимают участие в модификации полисахаридов этого компартмента (главным образом гемицеллюлоз), следствием чего может быть появление олигосахаридов. Олигосахариды НТ, в свою очередь, могут быть следующим звеном в межклеточных и тканевых контактах, запуская интегрированный ответ клеток, в том числе путем их сенсбилизации к АБК, что приводит к формированию морозостойкого состояния растительного организма в целом. Подобный механизм формирования адаптационных процессов, по-видимому, является характерным именно

для озимых растений, т.е. его развитие контролируется геномом клетки, что может предоставить широкие возможности для генной инженерии, и способствовать созданию новых, устойчивых сортов.

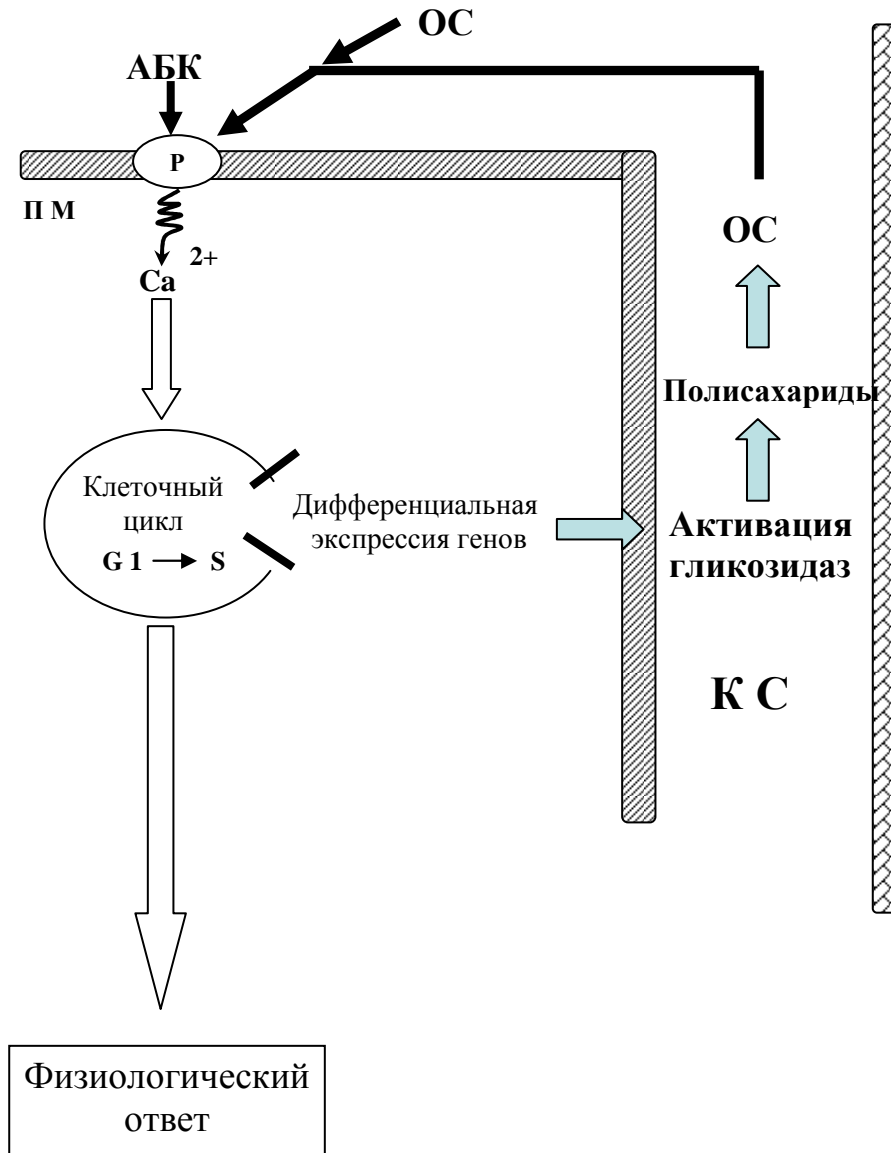


Рис. 11. Схема участия компонентов клеточной стенки в процессах, происходящих в ходе низкотемпературной адаптации растений. Р - рецептор, ПМ - плазматическая мембрана, КС – клеточная стенка, ОС – олигосахарин НТ.

Выводы

1. Показано, что повышение активности гликозидаз проростков пшеницы и ржи в первые часы воздействия низкой положительной температурой связано с формированием морозостойкости, то есть, включено в адаптивную программу озимых злаков.
2. Впервые обнаружено, что эндогенная высокоочищенная олигосахаридная фракция (олигосахарин НТ), образующаяся в процессе закаливания проростков озимой пшеницы низкой положительной температурой и инициирующая образование морозостойкого состояния, активизирует гликозидазы озимой пшеницы и при комнатной температуре.
3. Впервые установлено, что активация гликозидаз эндогенной высокоочищенной олигосахаридной фракцией, выделенной из проростков озимой пшеницы, проявляется только у озимых злаков и характеризуется отсутствием видовой и сортовой специфичности.
4. Впервые обнаружено, что индукция морозостойкого состояния под действием АБК приводит к активации гликозидаз и изменению пропорции нецеллюлозных полисахаридов клеточной стенки проростков озимой пшеницы.
5. Направленность и динамика действия низкой положительной температуры, АБК и олигосахарина НТ на активацию гликозидаз разных сортов злаковых являются маркерами адаптивных процессов при формировании морозостойкого состояния у растений.
6. Показано, что ответная реакция на внесение АБК на разных стадиях развития частично синхронизованной суспензионной культуры озимой пшеницы *Triticum timopheevii* Zhuk. отличается по степени подавления роста, деления и по времени, необходимому для формирования морозостойкости.
7. Сформировано представление, что, закаливание растений обусловлено субпопуляцией чувствительных клеток, реакция которых сопровождается образованием в процессе катаболизма полисахаридов клеточной стенки, в частности с помощью гликозидаз, интегрирующего клетки фактора (олигосахарина НТ), вовлечённого в формирование морозостойкого состояния растительного организма в целом.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Abscisic acid is involved into the cell wall modification during the process of cold hardiness formation in winter plants / A. Zabotin, T. Barisheva, I. Larskaya, V. Lozovaya, **O. Trofimova**, O. Zabolina // 8th International Cell Wall Meeting: Ann. abstr.- Norwich, 1998.
2. **Trofimova, O.I.** Effect of ABA on the growth and cell-wall glycosidase activities of winter wheat cell culture / **O.I. Trofimova**, T.S. Barisheva, A.I. Zabotin // XII Congress of FEPPS: Ann. Abstr.- Budapest, 2000.- P.22.

3. **Трофимова, О.И.** Некоторые особенности инициирования абсцизовой кислотой морозостойкого состояния клеток озимой пшеницы / **О.И. Трофимова**, А.И. Заботин // Вестник Башкирского университета.- 2001.- №2(II).- С.126-128.
4. **Трофимова, О.И.** Некоторые ответные реакции суспензионной культуры озимой пшеницы на АБК / **О.И. Трофимова**, А.И. Заботин // Международная конференция «Актуальные вопросы экологической физиологии растений в XXI веке»: Сб. тезисов.- Сыктывкар, 2001.-С.351-352.
5. Peculiarities of cell wall formation obtained during development of synchronized cell suspension culture of *Triticum timopheevii* Zhuk. / A. Zabotin, T. Barisheva, I. Larskaya, **O. Trofimova** // 9th International Cell Wall Meeting: Toulouse, 2001.- P.250.
6. Исследование регуляции метаболизма каллозы в клетках высших растений *in vitro* / А.И. Заботин, Т.С. Барышева, **О.И. Трофимова** и др. // Физиология растений.- 2002.- Т. 49, № 6.-С. 1-8.
7. **Трофимова, О.И.** Индуцированные АБК ответные реакции суспензионной культуры озимой пшеницы / **О.И. Трофимова** // 6-ая Пущинская школа молодых ученых: Сб. тезисов.- Пущино, 2002.- С. 239.
8. Клеточная стенка и гипотермический синдром озимых растений / А.И. Заботин, Д.А. Аюпова, Т.С. Барышева, О.А. Заботина, И.А. Ларская, **О.И. Трофимова**, Т.Е. Торощина // III съезд Биохимического общества: Сб. тезисов.- СПб, 2002.- С. 439.
9. **Трофимова, О.И.** Взаимодействие олигосахарида и АБК в процессе низкотемпературной адаптации озимой пшеницы / **О.И. Трофимова**, Т.Е. Торощина // 7-ая Пущинская школа молодых ученых: Сб. тезисов.- Пущино, 2003.- С.228.
10. The new system factor of cold resistance of winter plants / A. Zabotin, O. Zabolina T. Barisheva, I. Larskaya, T. Toroshina, **O. Trofimova** // Proceedings of the international scientific conference "New Geometry of Nature": Kazan, 2003.-V.II.- P. 402-406.
11. Новый системный фактор морозоустойчивости озимых растений / О.А. Заботина, Т.С. Барышева, И.А. Ларская, Т.Е. Торощина, **О.И. Трофимова**, А.И. Заботин // V съезд общества физиологов растений России и международная конференция "Физиология растений - основа фитобиотехнологии": Сб. тезисов.- Пенза, 2003.- С.275.
12. Oligosaccharins – a new systemic factor in the acquisition of freeze tolerance in winter plants / A.I. Zabotin., T.S. Barisheva, I.A. Larskaya, T.E. Toroshina, **O.I. Trofimova**, M.G. Hahn, O.A. Zabolina // X Cell Wall Meeting: Sorrento, 2004.- №19.- P.61.
13. Участие гликозидаз клеточной стенки в формировании низкотемпературной устойчивости озимой пшеницы / **О.И. Трофимова**, Т.С. Барышева, О.А. Заботина, Т.Е. Торощина, И.А. Ларская, А.И. Заботин // Материалы Всероссийской научной конференции «Стрессовые белки растений».- Иркутск, 2004.- С. 121-124.
14. Oligosaccharins – a new systemic factor in the acquisition of freeze tolerance in winter plants / A.I. Zabotin, T.S. Barisheva, I.A. Larskaya, T.E. Toroshina, **O.I. Trofimova**, M.G. Hahn, O.A. Zabolina // Plant Biosystems.-2005.- №1.-P.139-145.
15. Идентификация и характеристика посредника, вовлеченного в приобретение морозостойкости озимых растений / А.И. Заботин, О.А. Заботина, Т.С. Барышева, И.А. Ларская, Т.Е. Торощина, **О.И. Трофимова** // Второй международный симпозиум "Сиг-

нальные системы клеток растений: роль в адаптации и иммунитете": Тез. докл.- Казань, 2006.- С.40.

16. Олигосахарины являются естественными посредниками защитных реакций в растениях / О.А. Заботина, А.И. Заботин, М.Г. Хан, Т.Е. Торощина, Т.С. Барышева, И.А. Ларская, **О.И. Трофимова** // Второй международный симпозиум: "Сигнальные системы клеток растений: роль в адаптации и иммунитете": Тез. докл.- Казань, 2006.- С.42.

17. Торощина, Т.Е. Взаимодействие олигосахарина и АБК в реакции низкотемпературной адаптации проростков озимой пшеницы / Т.Е. Торощина, **О.И. Трофимова**, А.И. Заботин // Второй международный симпозиум: "Сигнальные системы клеток растений: роль в адаптации и иммунитете": Тез. докл. - Казань, 2006.-С.219.