

На правах рукописи



НИЛОВА Ирина Александровна

**УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ
К ВЫСОКОТЕМПЕРАТУРНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ РАЗНОЙ
ИНТЕНСИВНОСТИ: ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ
И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ**

03.01.05 – «Физиология и биохимия растений»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2019

Работа выполнена в Институте биологии – обособленном подразделении Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра "Карельский научный центр Российской академии наук"

Научный руководитель: чл.-корр. РАН,
доктор биологических наук, профессор
Титов Александр Федорович

Официальные оппоненты: **Веселов Александр Павлович**,
доктор биологических наук, профессор,
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского», профессор кафедры биохимии и биотехнологии
Гончарова Эльза Андреевна,
доктор биологических наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова», главный научный эксперт

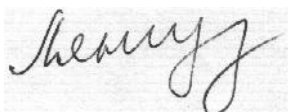
Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

Защита состоится «29» мая 2019 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д 002.211.02 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Ботаническом институте им. В.Л. Комарова Российской академии наук по адресу: 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2.
Тел. (812)372-54-42, факс (812) 372-54-43, dissovet.d00221102@binran.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического института имени В.Л. Комарова Российской академии наук (www.binran.ru).

Автореферат разослан “ ____ ” _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Лянгузова Ирина Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Температура окружающей среды является одним из экологических факторов, оказывающих наиболее сильное влияние на жизнедеятельность растений и их продуктивность. Как недостаток, так и избыток тепла практически всегда негативно сказываются на растениях и нередко становятся причиной их гибели. В силу этого, изучению влияния неблагоприятных температур на растения, в том числе высоких, посвящено большое количество не только экспериментальных исследований, но и работ монографического характера (Александров, 1975, 1985; Лархер, 1978; Туманов 1979; Альтергот, 1981; Генкель, 1982; Удовенко, Гончарова, 1982; Lambers et al., 1998; Веселов, 2001; Шакирова, 2001; Чиркова, 2002; Schulze et al., 2002; Larcher, 2003; Титов и др., 2006; Колупаев, Карпец, 2010; Гончарова, 2011; Войников, 2013; Mosa et al., 2017 и др). Однако несмотря на значительный объем накопленных экспериментальных данных и наблюдений интерес исследователей к изучению особенностей и механизмов ответной реакции растений на действие высоких температур по-прежнему не ослабевает. Из многочисленных публикаций следует, что любые отклонения температуры окружающей среды от оптимальных для роста и развития значений вызывают у растений широкий спектр физиолого-биохимических и молекулярно-генетических изменений в их клетках и тканях, которые связаны или с адаптацией, или характеризуют появление различных нарушений и/или повреждений и развитие деструктивных процессов, приводящих в конечном итоге к гибели растений. Среди многих реакций растений в ответ на повышение температуры наиболее полно изучены особенности роста, дыхания и фотосинтеза, а также синтез стрессовых (шоковых) белков, изменения в мембранах и гормональной системе (Семихатова, 1974; Лархер, 1978; Пьянков, 1993; Porter, Gawith, 1999; Веселов, 2001; Чиркова, 2002; Atkin et al., 2004; Креславский, 2007; Шишова и др., 2008; Таланова, 2009; Титов, Таланова, 2009; Hatfield et al., 2011; Gupta et al., 2013; Hatfield, Prueger, 2015; Niu, Xiang, 2018). При этом отмечено, что значительная часть этих изменений носит неспецифический (общий), а часть – специфический характер (присущий только растениям, испытывающим высокотемпературное воздействие) (Шакирова, 2001; Чиркова, 2002, Титов и др., 2006; Кузнецов, 2009; Mittler et al, 2012; Bahuguna, Jagadish, 2015; Wan, Jiang, 2016). Однако, как показывает анализ литературы, недостаточно изученными остаются особенности изменения физиологических, биохимических и молекулярно-генетических показателей в клетках и тканях растений при высокотемпературных воздействиях разной интенсивности. Вместе с тем многочисленные данные указывают на то, что характер и направленность изменения многих из этих показателей может существенным образом изменяться (как количественно, так и качественно) в зависимости от напряженности неблагоприятного фактора, что, вероятно, имеет важное, если не основное значение для процесса формирования устойчивости в этих условиях (Удовенко, 1979; Титов, 1989; Топчиева, 1994; Титов и др., 2006). Поэтому, исследования физиолого-биохимических и молекулярно-генетических показателей, характеризующих ответную реакцию растений на высокотемпературные воздействия разной интенсивности, проведенные на одном и том же объекте в строго

контролируемых условиях внешней среды, позволят лучше понять механизмы, благодаря которым растения приобретают повышенную устойчивость и оказываются способными переносить без губительных последствий неблагоприятные условия.

Цель и задачи исследования. Цель работы состояла в изучении ряда физиолого-биохимических и молекулярно-генетических реакций растений озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L., с. Московская 39) на высокотемпературные воздействия разной интенсивности.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить динамику теплоустойчивости и провести анализ изменения некоторых других физиологических показателей (рост, оводненность) у растений озимой пшеницы, подвергнутых высокотемпературным воздействиям разной интенсивности.

2. Изучить изменения ряда биохимических показателей (активность супероксиддисмутазы, образование активных форм кислорода, накопление малонового диальдегида) в листьях растений озимой пшеницы, подвергнутых высокотемпературным воздействиям разной интенсивности.

3. Исследовать динамику содержания транскриптов генов *HSP70*, *BiP*, *HSP90*, *HSP16,9* и *HSP19*, кодирующих белки теплового шока, в листьях растений озимой пшеницы, подвергнутых высокотемпературным воздействиям разной интенсивности.

4. Исследовать динамику содержания транскриптов генов *IRE1*, *BI-1*, участвующих в развитии защитных реакций, связанных со стрессом эндоплазматического ретикула, в листьях растений озимой пшеницы, подвергнутых высокотемпературным воздействиям разной интенсивности.

5. Изучить экспрессию генов *BAX.2* и *MCAII*, как возможных участников программируемой клеточной гибели, и установить наличие признаков программируемой клеточной гибели в листьях растений озимой пшеницы, подвергнутых высокотемпературным воздействиям разной интенсивности.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Ответные реакции растений озимой пшеницы, фиксируемые по ряду физиолого-биохимических и молекулярно-генетических показателей, изменяются не только количественно, но и качественно в зависимости от интенсивности и продолжительности высокотемпературного воздействия.

2. Высокие субповреждающие температуры, а также высокие повреждающие температуры, но только в начальный период их действия, вызывают у растений озимой пшеницы активацию экспрессии генов, кодирующих белки, выполняющие защитные функции. При этом динамика накопления транскриптов генов *HSP70* и *HSP90* при разных субповреждающих температурах (33°, 37°C) и повреждающей температуре (43°C) отличается только количественно, а различия в динамике накопления транскриптов генов *BiP*, *IRE1*, *BI-1* при температурах 33°, 37°, 43°C носят качественный характер.

3. Воздействие на растения озимой пшеницы высокой повреждающей температуры (43°C) приводит к нарушению ряда физиологических процессов (рост, водообмен) и подавлению активности гена *IRE1*, кодирующего белок *IRE1*, выпол-

няющий защитные функции. Одновременно с этим усиливается экспрессия генов *ВАХ.2* и *МСАII*, кодирующих белки, участвующих в механизмах программируемой клеточной гибели. В клетках растений развиваются деструктивные процессы, их теплоустойчивость резко падает и в дальнейшем они погибают.

Научная новизна. Впервые проведено сравнительное изучение физиолого-биохимических и молекулярно-генетических особенностей реакции озимой пшеницы (*Triticum aestivum*, с. Московская 39) на высокотемпературные воздействия разной интенсивности и продолжительности. Впервые определены количественные и качественные различия в динамике формирования устойчивости листьев растений пшеницы, испытывающих воздействие температур от 29° до 45°С, а также установлено существование различий в образовании супероксид анион-радикала, пероксида водорода и в содержании малонового диальдегида в этих условиях. Впервые показано, что динамика накопления в листьях растений пшеницы транскриптов генов *HSP70* и *HSP90* изменяется в зависимости от интенсивности высокотемпературного воздействия только количественно, тогда как динамика накопления транскриптов генов *BiP*, *IRE1*, *BI-1*, *МСАII* меняется в этих условиях еще и качественно. Впервые описаны изменения в экспрессии генов *HSP19* и *ВАХ.2* в клетках листьев растений при неблагоприятных воздействиях.

Практическая значимость работы. Полученные результаты позволили выявить взаимосвязь между отдельными физиолого-биохимическими и молекулярно-генетическими процессами, происходящими в растениях озимой пшеницы с. Московская 39 при высокотемпературных воздействиях разной интенсивности, с одной стороны, и их теплоустойчивостью, с другой стороны. Эти данные могут быть использованы в селекционно-генетическом процессе в качестве научной основы для осуществления целенаправленного отбора перспективных генотипов и создания новых сортов пшеницы, отличающихся высокой теплоустойчивостью. Помимо этого, результаты проведенных исследований могут быть использованы при чтении курсов и спецкурсов по физиологии растений и экологии растений для студентов эколого-биологических, биологических, агротехнических и сельскохозяйственных факультетов.

Личный вклад автора в проведенное исследование. Автор лично принимала участие в планировании экспериментов, в сборе, обработке и анализе экспериментальных данных, анализе литературных данных по теме работы. При непосредственном участии автора сформулированы выводы и основные положения диссертации, подготовлены и опубликованы научные работы (статьи и тезисы) по представленной теме.

Связь работы с плановыми исследованиями и научными программами. Исследования проводились с 2013 по 2018 гг. в соответствии с планами НИР Института биологии КарНЦ РАН по темам «Физиолого-биохимические и молекулярно-генетические механизмы реакции растений на действие неблагоприятных температур и тяжелых металлов» (№ г.р. 012011664444), «Механизмы адаптации и особенности жизнедеятельности растений в условиях действия низких температур» (№ г.р. 01201358737), «Роль общих и специализированных механизмов в устойчивости растений к действию неблагоприятных температур» (№ г.р. АААА-А17-117022850044-2).

Апробация работы. Результаты научных исследований автора были представлены в виде устных и стендовых докладов на различных научных конференциях, симпозиумах и семинарах, как в России, так и за рубежом: на II всероссийской научной интернет-конференции с международным участием «Ботаника и природное многообразие растительного мира» (Казань, 2014), всероссийской научной конференции с международным участием "Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий" (Петрозаводск, 2015), III (XI) международной ботанической конференции молодых ученых в Санкт-Петербурге (Санкт-Петербург, 2015), XI международном симпозиуме «Plant signaling and behavior» (Санкт-Петербург, 2016), научной конференции с международным участием и школе молодых ученых «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма» (Санкт-Петербург, 2016), II международном симпозиуме «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» и международной научной школе «Роль активных форм кислорода в жизни растений» (Уфа, 2017), научной конференции и школе для молодых ученых «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты» (Судак, 2017), международной научной конференции «Young biologists science week 2017» (Петрозаводск, 2017), XXV международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2018), II международной научно-практической конференции «Клеточная биология и биотехнология растений» и школе молодых ученых «Биология растительной клетки: от теории к практике» (Минск, 2018).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 работ, в том числе 6 статей в журналах, включенных в перечень ВАК РФ.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 163 страницах, содержит 26 рисунка, 10 таблиц, включает в себя 500 литературных источников, в том числе 384 на иностранном языке. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследования, описания результатов и их обсуждения, заключения и списка литературы.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность своим учителям и наставникам: научному руководителю чл.-корр. РАН, д.б.н., профессору А.Ф. Титову, к.б.н. Л.В. Топчиевой, а также всем сотрудникам лаборатории экологической физиологии растений Института биологии КарНЦ РАН и особенно д.б.н. В.В. Талановой, д.б.н. Н.М. Казниной, к.б.н. Н.С. Репкиной и А.А. Игнатенко за всестороннюю помощь, консультации и рекомендации, сделанные в процессе проведения работы и при написании диссертации. Автор также выражает искреннюю признательность сотруднику лаборатории паразитологии растений и животных Института биологии КарНЦ РАН к.б.н. В.В. Займль-Бухингер и сотруднику аналитической лаборатории Института леса КарНЦ РАН К.М. Никеровой за поддержку и ценные советы.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на проростках озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39.

Растения в течение 7 сут выращивали в рулонах фильтровальной бумаги на модифицированном питательном растворе при температуре воздуха 22°C, его относительной влажности 60 – 70%, освещенности ФАР 180 мкмоль/(м²·с), фотопериоде 14 ч (Гончарова и др., 1983). Затем проростки пшеницы подвергали температурным воздействиям разной интенсивности (опыт), при этом диапазон температур варьировал от 29° до 45°C при сохранении прочих условий неизменными. Продолжительность высокотемпературного воздействия также варьировала – от 15 мин до 5 сут. В качестве контроля выступали проростки, выращенные в оптимальных (22°C) температурных условиях.

Теплоустойчивость растений оценивали двумя способами а) после 5-минутного прогрева высечек из листа в водном термостате при последовательном повышении температуры с интервалом в 0,4°C (Александров, 1963). В качестве критерия устойчивости использовали температуру гибели 50% (ЛТ₅₀) палисадных клеток листа, определяемую по деструкции хлоропластов и коагуляции цитоплазмы; б) после воздействия температур 33°, 37° и 43°C в течение 1 – 3 сут и отрастания в нормальных условиях при температуре 22°C. Устойчивость проростков оценивали по степени повреждения их листьев и выживаемости.

Оводненность тканей и рост листьев пшеницы анализировали с помощью общепринятых методов.

Общую активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли спектрофотометрическим методом, основанным на способности фермента ингибировать фотохимическое восстановление нитросинего тетразолия (Beauchamp, Fridovich, 1971).

Генерацию супероксид анион-радикала и содержание пероксида водорода оценивали качественным методом *in situ* путем восстановления нитросинего тетразолия с образованием фиолетового преципитата формазана методом, описанным Джабсом и др. (Jabs et al., 1996), и полимеризации 3,3-диаминобензидина при вступлении в контакт с пероксидом водорода в присутствии пероксидазы методом, описанным Тордал-Кристенсен и др. (Thordal-Christensen et al., 1997), соответственно.

Содержание малонового диальдегида (МДА) оценивали по накоплению продукта его реакции с тиобарбитуровой кислотой спектрофотометрическим методом (Kumar, Knowles, 1993; Сибгатуллина и др., 2011).

Содержание белка определяли по методу Брэдфорда, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (Bradford, 1976).

Накопление транскриптов генов анализировали методом ПЦР в режиме реального времени.

Фрагментацию ДНК оценивали с помощью электрофоретического метода. ДНК выделяли согласно методу, описанному в работе Мёллер и др. (Möller et al., 1992).

Повторность и статистическая обработка результатов. Каждый отдельный опыт повторялся не менее 3 раз. Биологическая повторность в пределах каждого

варианта опыта – 3-6 кратная, при анализе ростовых показателей – 50-кратная. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилки. В случае нормального распределения математическую обработку данных проводили, используя параметрические критерии, а результаты представлялись в виде средних арифметических значений и их стандартных ошибок, оценку достоверности различий проводили с помощью критерия Стьюдента (при $p \leq 0,05$). Если распределение отличалось от нормального (в случае данных по экспрессии генов), использовали непараметрические критерии (Вилкоксона-Манна-Уитни и Краскела-Уоллиса). Статистическая обработка данных проведена с использованием программ Microsoft Excel и Statgraphics.

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр РАН».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Некоторые физиологические особенности реакции растений озимой пшеницы на высокотемпературные воздействия разной интенсивности

1.1. Теплоустойчивость клеток листьев

Исследование влияния высокотемпературных воздействий разной интенсивности (от 29° до 45°С) на растения озимой пшеницы с. Московская 39 показало, что теплоустойчивость остается неизменной при действии на растения температур 29° – 31°С. Было также установлено, что под влиянием температур 33° и 35°С происходит небольшое, но статистически значимое повышение теплоустойчивости клеток листьев через 1 сут с достижением максимума через 2 сут. В дальнейшем этот уровень устойчивости сохранялся у растений на протяжении всего эксперимента (рис. 1а). Отметим, что при температуре 35°С абсолютные значения теплоустойчивости были несколько выше, чем при 33°С. Под влиянием температуры 37°С рост теплоустойчивости был зафиксирован уже через 30 мин, а её максимум достигался спустя 3 сут (рис. 1б). При 39°С теплоустойчивость также возрастала через 30 мин. При этом максимальные значения теплоустойчивости регистрировали через 1 сут. Дальнейшее увеличение экспозиции проростков растений при 37° и 39°С не вызывало дополнительного прироста теплоустойчивости.

Более высокие температуры – 43° и 45°С – оказывали сходное действие на теплоустойчивость пшеницы: под их влиянием зафиксирован быстрый рост теплоустойчивости листьев уже в первые минуты воздействия, а затем – резкое её снижение (рис. 1в). Наблюдаемые в этом случае изменения характера реакции растений свидетельствует о том, что действующие на них температуры относятся к зоне теплового повреждения. Отметим, что реакция растений на действие температур 43° и 45°С различалась только количественно. В частности, при температуре 43°С теплоустойчивость возрастала и снижалась медленнее, чем при 45°С, но максимальный прирост теплоустойчивости при 43°С был несколько выше, чем при 45°С.

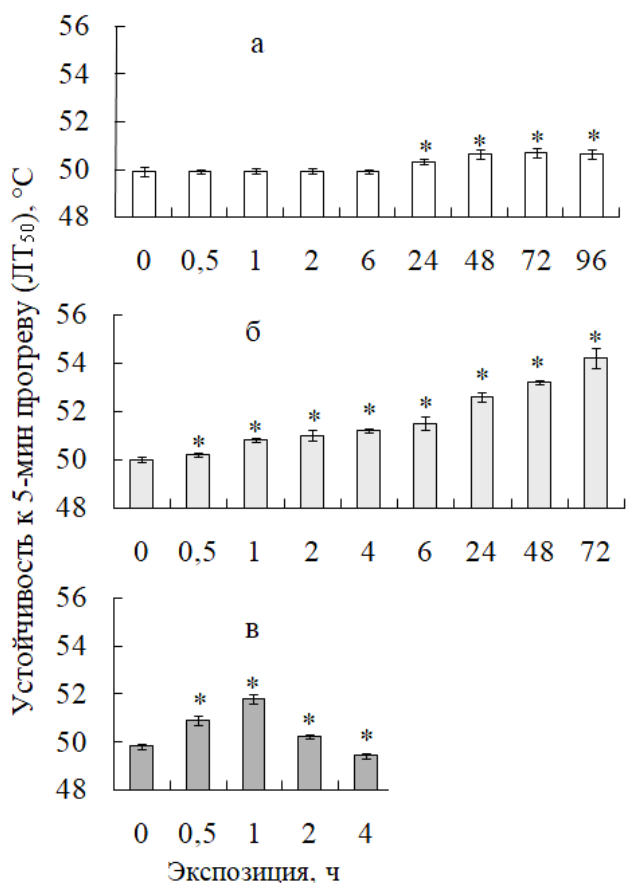


Рис. 1. Влияние высоких температур на динамику теплоустойчивости растений озимой пшеницы с. Московская 39: а – 33°, б – 37°, в – 43°С.

Здесь и далее: * – отличия от исходного уровня статистически значимы при $p \leq 0,05$. Исходный уровень – это значение показателя, зафиксированное у недельных проростков пшеницы, выращенных при температуре воздуха 22°С.

Далее наши исследования были направлены на оценку выживаемости растений и степени повреждения листьев после воздействия на них температур 33°, 37° и 43°С. Полученные результаты показали, что выживаемость растений, подвергнутых действию температур 33° и 37°С в течение 1 – 3 сут и затем перенесенных на отрастание в обычные условия (22°С в течение 7 сут), составляет 100%. При этом 1-й и 2-й листья не имели видимых признаков повреждения (табл. 1). В отличие от этого, через 7 сут отрастания при оптимальной температуре после воздействия температуры 43°С в течение 1 сут выживаемость растений слегка снижалась (до 95%), а степень повреждения 1-го листа составляла 50% и 25% у 2-го листа. В случае увеличения экспозиции растений при 43°С до 2 сут выживаемость снижалась до 80%, степень повреждения 1-го листа достигала 65%, а 2-го листа – 45%. Действие этой температуры в течение 3 сут приводило к снижению выживаемости растений более, чем на 50% и к еще более значительным повреждениям 1-го и 2-го листьев.

Из полученных данных следует, что температуры 33° и 37°С не оказывают влияния на выживаемость растений озимой пшеницы сорта Московская 39 и не вызывают видимых признаков их повреждения, в то время как температура 43°С не только приводит к снижению теплоустойчивости клеток листьев, но и к повреждению растений, а через 3 сут воздействия – к их гибели.

Таким образом, проведенные исследования показали, что характер изменения теплоустойчивости листьев пшеницы варьирует как количественно, так и качественно в зависимости как от температурного диапазона (зоны), к которому относится действующая на растения температура, так и от интенсивности высоко-

температурного воздействия (в частности, когда растения испытывают действие температур, относящихся к одной температурной зоне).

Таблица 1

Влияние высоких температур на выживаемость растений и степень повреждения листьев озимой пшеницы с. Московская 39, % от контроля

Экспозиция, ч	Выживаемость растений, %			Степень повреждения 1-го листа, %			Степень повреждения 2-го листа, %		
	33°	37°	43°	33°	37°	43°	33°	37°	43°
24	100	100	95	0	0	50	0	0	25
48	100	100	80	0	0	65	0	0	45
72	100	100	15	0	0	80	0	0	85

Контроль – значение показателя у проростков, не подвергавшихся воздействию высоких температур.

1.2. Рост и оводненность листьев

Изучение влияния высоких температур на ростовые показатели и оводненность проростков пшеницы показало, что при температурах 33°, 35° и 37°C снижение скорости роста 1-го листа происходит через 1 сут воздействия, которое сохранялось на протяжении всего эксперимента (табл. 2). При этих температурах прирост в длину 1-го листа был не менее 11% через 1 сут и 24% через 5 сут. При 39°C прирост 1-го листа был минимальным, а температуры 41° – 45°C вызывали полную остановку его роста.

Наряду с линейным ростом у растений под влиянием высоких температур изменялся процесс накопления сырой и сухой биомассы. Нами установлено, что при температурах 33° и 37°C накопление сырой и сухой биомассы побега пшеницы не прекращается, однако значения этих показателей становятся несколько ниже, чем при 22°C. При температуре 43°C накопление сухой биомассы также несколько снижалось относительно растений, выращенных при 22°C, а содержание сырой биомассы резко уменьшалось даже по сравнению с исходным уровнем уже через 1 сут от начала ее воздействия. Поскольку действие высоких температур оказывает сильное влияние на водообмен растений (Фархутдинов и др., 2003; Гончарова, 2011; Кудоярова, 2014; Akter, Islam, 2017), то такое снижение накопления сырой биомассы, очевидно, связано не только с торможением роста, но и с изменениями содержания воды в тканях листа пшеницы. Нами обнаружено, что если при действии температур 33° и 37°C содержание воды в тканях листа практически не изменялось, то при 43°C зафиксировано значительное снижение этого показателя (на 6, 22 и 30% через 1, 2 и 3 сут, соответственно), что дополнительно усугубляло негативное влияние экстремально высокой температуры на растения.

Влияние высоких температур на суточный прирост в длину 1-го листа растений озимой пшеницы с. Московская 39, % от исходного уровня

Температура, °С	Экспозиция, сут					
	0	1	2	3	4	5
22	100	115*	127*	130*	131*	131*
33	100	118*	122*	124*	126*	126*
35	100	114*	120*	123*	123*	124*
37	100	111*	121*	123*	124*	124*
39	100	104*	104*	105*	105*	105*
41	100	100	100	100	100	100
43	100	100	100	100	-	-
45	100	100	-	-	-	-

За 100 % принята длина 1-го листа ($14,3 \pm 1,7$ см) у 7-дневных проростков, находящихся при 22°C.

Представленные выше данные по динамике теплоустойчивости, изменению ростовых показателей, оводненности тканей листа пшеницы, а также анализ литературы позволили нам не только ранжировать изученные температуры по характеру их действия и степени влияния на указанные показатели жизнедеятельности растений, но и выбрать температуры для дальнейшего исследования биохимических и молекулярно-генетических особенностей реакции проростков пшеницы на высокотемпературные воздействия разной интенсивности.

2. Некоторые биохимические особенности реакции растений озимой пшеницы на высокотемпературные воздействия разной интенсивности

2.1. Динамика активности в листьях супероксиддисмутазы (СОД)

В ходе нашего исследования установлено, что активность СОД в листьях проростков пшеницы при 33°C не изменяется в течение всего эксперимента (рис. 2). Под влиянием температуры 37°C активность СОД статистически значимо возрастала на 2-е и 3-и сут. Действие температуры 43°C приводило к очень быстрой активизации фермента СОД: его активность повышалась уже через 15 мин и продолжала возрастать в течение всего опыта. При этом активность СОД при 43°C была значительно выше, чем при 37°C.

2.2. Динамика содержания в листьях малонового диальдегида (МДА)

В ходе нашего исследования было также установлено, что высокотемпературные воздействия разной интенсивности неодинаково влияют на накопление в листьях пшеницы МДА (табл. 3). При температуре 33°C содержание МДА в листьях растений не изменялось. При действии температуры 37°C статистически значимое повышение концентрации МДА в листьях наблюдалось через 1 и 2 сут от начала эксперимента. Температура 43°, также как и 37°, индуцировала накоп-

ление МДА в листьях пшеницы через 1 и 2 сут, однако в этом случае его содержание было многократно выше, чем при 37°C.

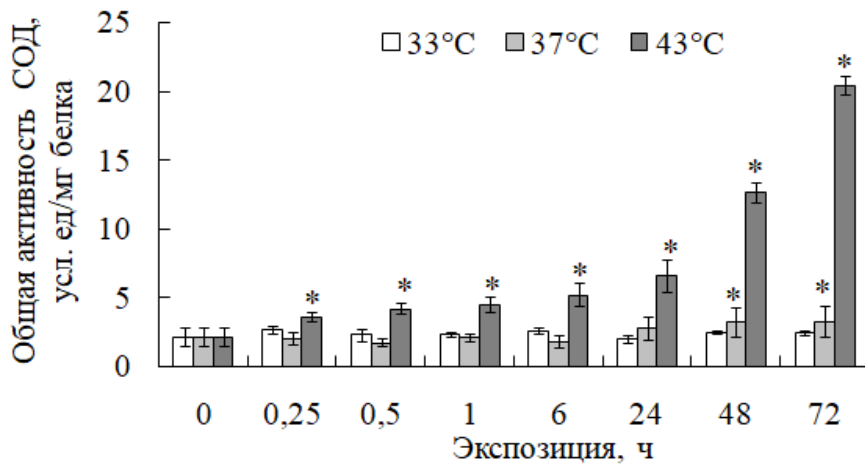


Рис. 2. Влияние высоких температур (33°, 37°, 43°C) на динамику общей активности СОД в листьях растений озимой пшеницы с. Московская 39.

Полученные данные указывают на то, что с повышением интенсивности температурного воздействия содержание МДА в листьях пшеницы возрастает. Наряду с этим нами изучена динамика генерации АФК и показано, что с повышением интенсивности высокотемпературного воздействия содержание АФК увеличивается (данные представлены в диссертации), что, очевидно, и явилось причиной усиления перекисного окисления липидов.

Таблица 3

Влияние высоких температур на содержание малонового диальдегида (МДА) в листьях растений озимой пшеницы с. Московская 39 (в мкМ/г сырого веса)

Экспозиция, ч	Температура, °С		
	33°	37°	43°
0	12,7 ±1,7	12,7 ±1,7	12,7 ±1,7
0,25	13,0 ±2,1	11,6 ±1,0	12,9 ±0,1
0,5	13,1 ±2,2	12,9 ±2,0	13,3 ±1,6
1	14,6 ±2,2	12,2 ±1,2	12,8 ±1,3
6	15,8 ±3,4	13,2 ±0,1	21,4 ±1,3
24	11,5 ±1,6	19,3 ±1,7*	42,3 ±1,9*
48	10,3 ±0,1	20,5 ±0,5*	103,3±8,0*

Обобщая все вышеизложенное можно заключить, что направленность исследуемых биохимических реакций существенным образом зависит от интенсивности высокотемпературного воздействия. Например, температура 33°C практически не влияла на изученные нами показатели. Тем не менее, у растений под влиянием этой температуры замедлялся рост (см. раздел 1.2), т.е. ее действие при-

водит к определенным отклонениям в организме растений от нормы или, как мы полагаем, развитию «мягкого» стресса, если следовать подходу и терминологии, предложенными Балогом с соавт. (Balogh et al., 2013).

Более высокая температура (37°C) индуцировала повышение активности СОД, но в то же время вызывала умеренное накопление МДА в листьях пшеницы. Несмотря на это растения характеризовались высокой теплоустойчивостью (см. раздел 1.1). Можно предположить, что при такой интенсивности высокотемпературного воздействия в мембранах и в отдельных внутриклеточных структурах появляются определенные нарушения, но они являются обратимыми. Очевидно, растения с ними успешно справляются за счет активации защитных механизмов. Соответственно, действие этой температуры на растения можно определить как «средний» стресс.

При 43°C высокой активности СОД, очевидно, уже было не достаточно, чтобы в полной мере компенсировать повреждающие эффекты, обусловленные действием этой температуры (что, в частности, выражается в значительном накоплении в листьях растений МДА). Поэтому теплоустойчивость растений при 43°C возрастала только в начальный период температурного воздействия, а затем отмечено ее резкое снижение, повреждение и гибель растений (см. раздел 1.1), что говорит о развитии «жесткого» стресса. Таким образом, с увеличением интенсивности высокотемпературного воздействия до определенного предела, с одной стороны, возрастает «сопротивляемость» растений, а с другой стороны, постепенно развиваются и нарастают деструктивные процессы, и, как следствие, наблюдается повреждение клеток и тканей растения.

3. Некоторые молекулярно-генетические особенности реакции растений озимой пшеницы на высокотемпературные воздействия разной интенсивности

В последние годы при изучении устойчивости растений к действию высоких температур особое внимание уделяется молекулярно-генетическим механизмам, и прежде всего механизмам, затрагивающим функциональную активность генетического аппарата. В целом в ряде работ показано, что повышение устойчивости растений, наблюдаемое в ответ на действие высокой температуры, непосредственно связано с изменениями в экспрессии достаточно большого числа генов (Rizhsky et al., 2002; Volkov et al., 2003; Лутова и др., 2010).

3.1. Динамика содержания в листьях транскриптов генов *HSP*

Нами показано, что накопление транскриптов гена *HSP70*, кодирующего цитоплазматический белок теплового шока, который является шапероном (heat shock protein – HSP) с молекулярной массой 70 кДа, при действии на растения температур 33°, 37° и 43°C статистически значимо увеличивается уже через 15 мин от начала теплового воздействия, но после достижения максимального уровня через 1 ч наблюдалось его снижение (рис. 3а). Аналогичное действие указанные температуры оказывали на динамику экспрессии гена *HSP90* (данные представлены в диссертации). Кроме того, нами изучена динамика содержания мРНК и других генов, кодирующих белки теплового шока, в частности *HSP19* и

HSP16,9. Показано, что с увеличением интенсивности высокотемпературного воздействия и его продолжительности накопление транскриптов этих генов возрастает (данные представлены в диссертации).

Известно, что действие на растения высоких температур может приводить к накоплению в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) и цитозоле большого количества неправильно упакованных белков, что вызывает развитие стресса эндоплазматического ретикулума (ЭР-стресса) и даже гибель клеток (Deng et al., 2013; Wan, Jiang, 2016). Поэтому усиление контроля за качеством упаковки белка является важной составляющей формирования теплоустойчивости растений. При ЭР-стрессе в растительной клетке активируется защитный механизм – unfolded protein response (UPR) (Li, 2012; Iwata, Koizumi, 2012; Kørner et al., 2015). Основным регулятором UPR выступает белок BiP (binding immunoglobulin protein – HSP70, локализованный в ЭР), который связывается с белками, имеющими нарушенную структуру, направляет их на рефолдинг или деградацию. Однако увеличение содержания белков с нарушенной структурой в ЭР приводит к тому, что свободных молекул BiP становится недостаточно и это является сигналом для синтеза дополнительного количества транскриптов, поэтому накопление транскриптов гена *BiP* считается маркером ЭР-стресса (Leborgne-Castel et al., 1999; Chen, Brandizzi, 2014).

При действии на проростки температуры 33°C в клетках листьев уже через 15 мин зафиксировано снижение содержания мРНК этого гена (рис 3б). Низкий уровень экспрессии *BiP* был отмечен вплоть до окончания закаливания растений (3 сут) при данной температуре. Экспонирование проростков при 37°C, напротив, вызывало многократное повышение содержания транскриптов этого гена уже через 15 мин с достижением максимального уровня после 30 мин прогрева. При более продолжительном воздействии температуры 37°C отмечено снижение уровня экспрессии *BiP*, а затем (через 1 сут), его повторное повышение. При температуре 43°C в листьях проростков уже через 15 мин зафиксировано увеличение содержания транскриптов этого гена, которое через 1 ч сменялось снижением. Отметим также, что при температуре 37°C содержание мРНК гена *BiP* было значительно выше, чем при 43°C через 15 мин, 30 мин и 24 ч.

Из полученных данных следует, что при температуре 33°C («мягком» стрессе) в листьях пшеницы не происходит накопления транскриптов гена *BiP*, а следовательно, можно полагать, что развитие ЭР-стресса при этом также не происходит. Повышение интенсивности высокотемпературного воздействия до 37°C («средний» стресс), напротив, приводит к усилению экспрессии этого гена. В данном случае, это может быть связано с быстрым повышением устойчивости растений и синтезом стрессовых (шоковых) белков *de novo* (Титов, 1989; Титов и др., 2006), что, в свою очередь, приводит к повышению нагрузки на белоксинтезирующий аппарат клетки и, как следствие, к увеличению количества белков с нарушенной структурой. Действие температуры 43° («жесткий» стресс) также вызывает накопление транскриптов гена *BiP*.

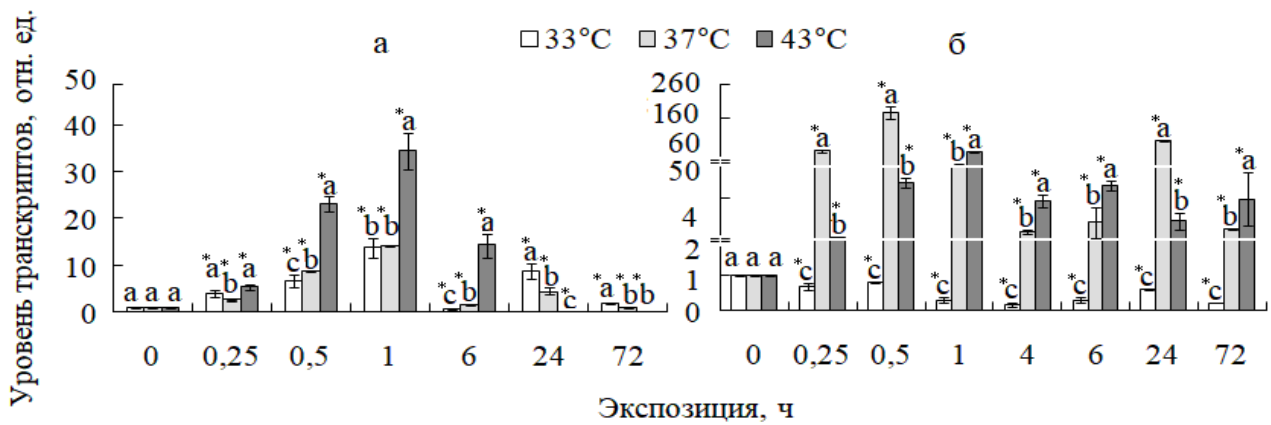


Рис. 3. Влияние высоких температур (33°, 37°, 43°C) на динамику уровня транскриптов генов *HSP70* (а) и *BiP* (б) в листьях растений озимой пшеницы с. Московская 39. Здесь и далее: разные латинские буквы обозначают статистически значимые различия между температурными вариантами при $p \leq 0,05$ в пределах каждой экспозиции.

Обобщая все вышеизложенное можно заключить, что для «мягкого», «среднего» и «жесткого» стресса характерно накопление транскриптов генов *HSP70* и *HSP90*. Кроме того, при «среднем» и «жестком» стрессе также происходит накопление транскриптов гена *BiP*, а при «мягком» стрессе изменения в содержании транскриптов этого гена наименее выражены. Следует отметить, что ответная реакция растений также зависит от продолжительности высокотемпературного воздействия. Так, накопление транскриптов генов, кодирующих высокомолекулярные цитоплазматические *HSP70* и *HSP90*, происходит в основном в начальный период действия высоких температур (до 6 ч), тогда как накопление транскриптов гена *BiP*, кодирующего белок, который расположен в ЭР, отмечено также при более продолжительных высокотемпературных воздействиях (от 24 до 48 ч).

3.2. Динамика содержания в листьях транскриптов генов системы контроля качества белка (*IRE1*, *BI-1*)

Еще одним участником UPR является белок IRE1 (inositol-requiring enzyme 1) (Chen, Brandizzi, 2013; Ruberti et al., 2015). Он связан с *BiP* и обычно находится в неактивном состоянии. Если *BiP* присоединяется к белку с нарушенной структурой, то IRE1 переходит в активное состояние (Зверев, Брюханов, 2012). После чего IRE1 участвует в активации различных транскрипционных факторов, которые, в свою очередь, усиливают экспрессию генов, кодирующих белки шапероны, в том числе *HSP70* и *BiP* (Liu, Howell, 2010; Zhang et al., 2015).

Нами было установлено, что воздействие температуры 33°C вызывает снижение уровня транскриптов гена *IRE1* в листьях пшеницы уже в первые минуты высокотемпературного воздействия, затем, через 24 ч, этот показатель возвращается к исходному уровню (рис. 4а). При температуре 37°C содержание транскриптов этого гена в клетках листьев, напротив, повышалось через 15 мин, достигало максимума через 1 ч, а затем снижалось и через 72 ч воздействия значимо не отличалось от исходного уровня экспрессии этого гена. Действие температуры 43°

аналогично температуре 33°C проводило к резкому снижению содержания транскриптов гена *IRE1* через 15 мин, а через 72 ч их содержание возвращалось к исходному уровню.

Интересно отметить, что максимальный уровень экспрессии *IRE1* наблюдался при температуре 37°C, вызывающий «средний» стресс, т.е. в условиях наибольшего прироста теплоустойчивости. По всей видимости, это связано с тем, что *IRE1* и *BiP* являются важной составляющей системы контроля качества белка в ЭР. Следовательно, увеличение уровня транскриптов гена *IRE1* на фоне накопления транскриптов гена *BiP* при «среднем» стрессе можно рассматривать как свидетельство включения и активизации еще одного защитного механизма, участвующего в повышении теплоустойчивости растений.

В ЭР также располагается белок *BI-1* (bax inhibitor-1), одной из функций которого является ингибирование процесса программируемой клеточной гибели (ПКГ) (Watanabe, Lam, 2008). Нами показано, что воздействие высоких температур на проростки пшеницы приводит к увеличению содержания транскриптов *BI-1* в листьях (рис. 4б). При температурах 33° и 37°C уже через 15 мин отмечено повышение содержания транскриптов этого гена до максимального уровня (примерно в 3 раза), который в дальнейшем сохранялся практически неизменным в течение всего периода теплового воздействия. Под влиянием температуры 43°C также через 15 мин происходило трехкратное повышение уровня транскриптов гена *BI-1*, через 1 ч содержание его транскриптов увеличивалось почти в 25 раз, затем оно резко снижалось и спустя 6 ч возвращалось к исходному уровню.

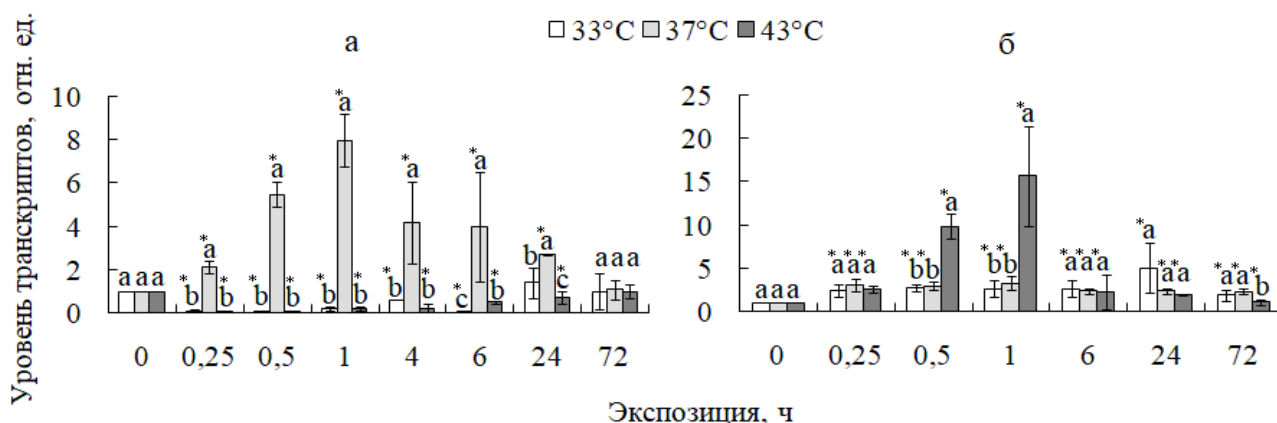


Рис. 4. Влияние высоких температур (33°, 37°, 43°C) на динамику уровня транскриптов генов *IRE1* (а) и *BI-1* (б) в листьях растений озимой пшеницы с. Московская 39.

Таким образом, нами было показано, что при «жестком» стрессе (43°C) достигается максимальный уровень экспрессии гена, кодирующего белок *BI-1*, тогда как при «мягком» и «среднем» стрессе (при 33° и 37°C, соответственно) его экспрессия повышается незначительно.

3.3. Динамика содержания в листьях транскриптов генов *ВАХ.2* и *МСАII*, кодирующих белки, участвующие в программируемой клеточной гибели (ПКГ)

У животных одним из наиболее изученных типов ПКГ является апоптоз, обязательными участниками этого процесса считают белок ВАХ (BCL2-associated X protein) и ферменты каспазы. У растений они отсутствуют. Однако у *Arabidopsis thaliana* L. найден белок Cdf 1 (cell growth defect factor 1), который обладает функциями схожими с ВАХ (Kawai-Yamada et al., 2005). У пшеницы также обнаружен гомолог Cdf1 – трансмембранный белок ВАХ.2 который, предположительно, участвует в процессах ПКГ у растений. В качестве ключевых ферментов ПКГ у растений могут выступать другие протеолитические ферменты – метакаспазы.

Нами установлено, что уже через 15 мин от начала действия всех исследуемых температур в клетках листьев пшеницы происходит статистически достоверный рост содержания транскриптов гена *ВАХ.2* (рис. 5а). При продолжительном действии температур 33° и 37°С содержание мРНК гена *ВАХ.2* снижалось. При температуре 43°С уровень экспрессии этого гена был высоким до конца эксперимента. Следует отметить, что при 33° и 37° содержание транскриптов гена *ВАХ.2* было примерно одинаковым и значительно меньше, чем при 43°С.

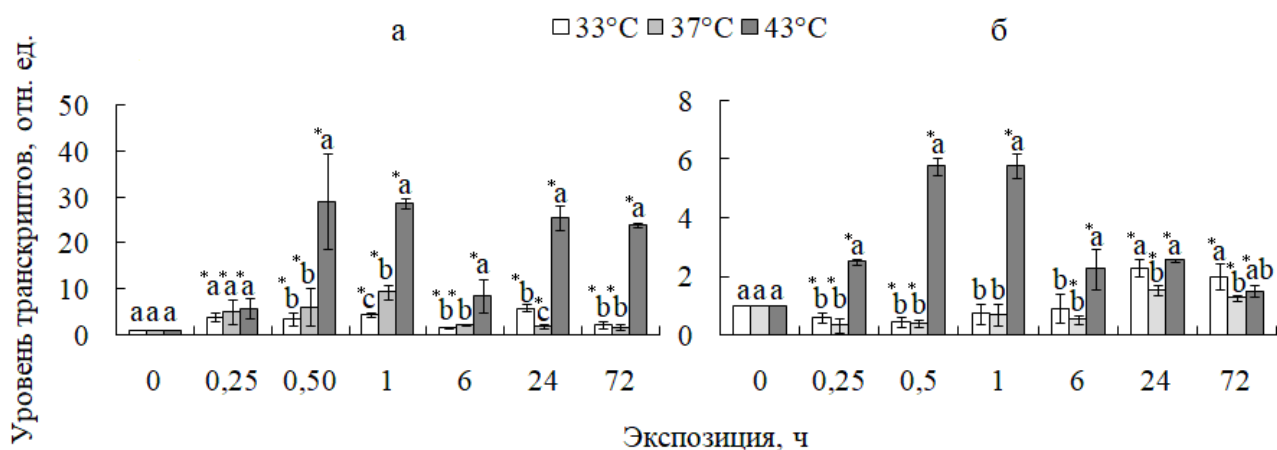


Рис. 5. Влияние высоких температур (33°, 37°, 43°С) на динамику уровня транскриптов генов *ВАХ.2* (а) и *МСАII* (б) в листьях растений озимой пшеницы с. Московская 39.

Было также обнаружено, что в ответ на действие высоких температур в клетках листьев пшеницы происходит изменение уровня транскриптов гена *МСАII*, кодирующий метакаспазу II типа (рис. 5б). При температуре 33° и 37°С в начальных период их действия отмечено небольшое снижение уровня транскриптов гена *МСАII*, далее, через сутки, происходило повышение экспрессии этого гена. При действии температуры 43°С содержание транскриптов гена *МСАII* повышалось уже в течение 1 ч, но затем, спустя 6 ч, мРНК этого гена становилось меньше.

3.4. Фрагментация ДНК в клетках листьев

Известно, что при высокоинтенсивном или продолжительном тепловом воздействии активируются процессы ПКГ (Fan, Xing, 2004; Reape et al., 2008). Одним из доказательств развития ПКГ служит фрагментация ядерной ДНК.

В нашем случае в варианте с температурой 33°C признаки нуклеосомной деградации ДНК (наличие так называемой «лестницы» на электрофореграмме) у проростков пшеницы отсутствовали. Их появление зафиксировано только в образцах ДНК, выделенной из листьев проростков, экспонированных при температуре 37° в течение 24 и 72 ч и при 43°C в течение 6, 24 и 72 ч.

Таким образом, при температуре 37° и 43°C увеличивается (а в случае действия повреждающей температуры 43°C сохраняется на повышенном уровне до конца эксперимента) уровень транскриптов гена *ВАХ.2*. Существенно, что появление признаков деградации ДНК в клетках при действии температур 37° и 43°C практически совпадало с повышением уровня транскриптов гена *МСАII*, что может быть свидетельством того, что *ВАХ.2* и *МСАII* участвуют в ПКГ растений озимой пшеницы, обусловленной действием высокой температуры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Повышение температуры воздуха, наблюдаемое в последние годы во многих регионах мира вследствие глобального изменения климата, считается одной из важных причин снижения урожайности растений (Ortiz et al., 2008; Brisson et al., 2010; Gouach et al., 2011; Olesen et al., 2011; Teixeira et al., 2013; Semenov et al., 2014; Morgounov et al., 2018). Поэтому вполне закономерно, что интерес исследователей к изучению механизмов устойчивости растений к действию высоких температур в последние годы усиливается.

Как следует из цели и задач данной работы, проведенные нами исследования были сосредоточены на изучении динамики теплоустойчивости проростков озимой пшеницы при действии высоких температур разной интенсивности, а также на ряде физиолого-биохимических (рост, оводненность тканей, активность СОД, накопление МДА) и молекулярно-генетических реакций (накопление транскриптов ряда генов, кодирующих белки, участвующие в механизмах формирования теплоустойчивости, а также кодирующих белки, предотвращающие развитие ПКГ или в ней участвующих).

Нами показано, что на физиолого-биохимическом уровне реакция растений на действие высоких закаливающих и повреждающих температур существенно различается. В частности, действие высоких закаливающих температур приводит к повышению теплоустойчивости растений, торможению роста, незначительному снижению оводненности тканей листа, активизации СОД и умеренному накоплению МДА. В отличие от этого, действие повреждающих температур приводит только к кратковременному повышению теплоустойчивости растений, вызывает полную остановку их роста и резкое падение оводненности тканей листа, индуцирует усиление активности СОД и вместе с этим вызывает значительное накопление МДА.

Из анализа полученных данных также следует, что примерно одинаковый по величине прирост теплоустойчивости при высокотемпературных воздействиях разной интенсивности может достигаться за счет изменения продолжительности их воздействия, например, через 6 ч при температуре 37°, или за 1 ч при 43°C (табл. 4). Однако, несмотря на близкий по величине прирост теплоустойчивости растений, накопление транскриптов HSP оказалось значительно выше при 43°, чем при 37°C. Очевидно, этот механизм привносят неодинаковый вклад в повышение теплоустойчивости растений, наблюдаемое при действии на них закаливающих температур и в начальный период действия повреждающих температур. Кроме того, в том и другом случае могут включаться и другие механизмы, которые нами не изучались.

Следовательно, при обсуждении экспериментальных данных важно учитывать, что активизация защитных механизмов зависит как от интенсивности, так и от продолжительности высокотемпературного воздействия. Например, в нашем случае ряд механизмов теплоустойчивости растений связанных, например, с накоплением транскриптов генов *HSP70* и *HSP90*, активизируется уже в начальный период (15 мин – 1 ч) действия высоких температур. Поэтому можно предположить, что повышение теплоустойчивости растений на 1,9° к краткосрочному нагреву, зарегистрированное в начальный момент действия повреждающей температуры 43°C (1 ч), в значительной мере обеспечивается за счет активизации синтеза HSP, т. е. усиления экспрессии генов *HSP70* и *HSP90*, а также за счет возрастания активности СОД.

В то же время, эти же HSP (*HSP70*, *HSP90*), по-видимому, вносят значительно меньший вклад в сопоставимый по величине прирост теплоустойчивости (1,6°) отмеченный при 37°C, так как для его достижения при данной температуре требуется намного более продолжительное ее действие (6 ч). Можно предположить, что в условиях этой температуры более весомый вклад в формирование теплоустойчивости вносит повышение активности генов, кодирующих белки ЭР, которые участвуют в ЭР-стрессе, в частности, *IRE1*. Именно при температуре 37° в наших опытах отмечен наибольший уровень транскриптов гена *IRE1*, в то время как при 43°C наблюдалось его резкое снижение. Интересно и то, что в начальный период (15 – 30 мин) действия температуры 37° экспрессия гена *BiP* была выше, чем при 43°C (рис. 3). Само накопление транскриптов гена *BiP*, как уже отмечалось, является маркером накопления в ЭР белков с нарушенной структурой (Leborgne-Castel et al., 1999), а также наряду с повышением уровня транскриптов гена *IRE1* оно свидетельствует об активизации защитных механизмов, обеспечивающих уменьшение количества таких белков (Liu, Howell, 2010), что в целом несомненно способствует процессу повышения теплоустойчивости при 37°C.

Заслуживает внимания и то, что вклад различных механизмов в повышение теплоустойчивости растений при действии температур, относящихся к одному температурному диапазону, тоже может быть разным. Так, нами было показано, что при действии закаливающей температуры 33° теплоустойчивость растений повышается на 0,8° только через 3 дня, а при действии температуры 37°C сходный по величине прирост теплоустойчивости (0,9°) наблюдается уже через 1 ч.

Вполне вероятно, что прирост устойчивости в начальный момент действия закаливающей температуры 37°, также как в начальный период действия повреждающей температуры 43°C, обеспечивается в значительной мере за счет синтеза HSP. Соответственно, наблюдаемое при температуре 33°C повышение теплоустойчивости растений происходит за счет активизации иных механизмов. Отметим также, что прирост теплоустойчивости при 33°C не сопровождался повышением экспрессии генов *BiP* и *IRE1*, что говорит об отсутствии при данной температуре в клетках листа озимой пшеницы белков с нарушенной структурой в ЭР, а следовательно, отсутствии необходимости в активизации дополнительных защитных механизмов.

Наконец, следует еще раз подчеркнуть, что в начальный период действия повреждающей температуры (43°C) активность большинства изученных нами защитных механизмов выше, чем при действии закаливающих температур (33° и 37°C), а при 37° выше, чем при 33°C.

Таблица 4

Влияние закаливающей (37°C) и повреждающей (43°C) температуры на физиолого-биохимические и молекулярно-генетические реакции растений озимой пшеницы с. Московская 39

Показатель	Температура и продолжительность ее воздействия	
	37°, 6 ч	43°, 1 ч
Прирост теплоустойчивости (ЛТ ₅₀), °C	1,6	1,9
Активность СОД, усл. ед./мг белка	1,8 ^{ns}	4,5
Содержание МДА, мкМ/г сыр. веса	13,2 ^{ns}	12,8 ^{ns}
Экспрессия генов, отн. ед		
<i>HSP70</i>	1,5	34,4
<i>BiP</i>	14,6	101,1
<i>HSP90</i>	0,7	9,3
<i>HSP16,9</i>	3,9	110,7
<i>HSP19</i>	1,6	29,6
<i>IRE1</i>	4	0,1
<i>BI-1</i>	2,4	18,4
<i>BAX.2</i>	2,3	28,8
<i>MCAII</i>	0,54	5,8

ns – статистически значимые отличия от исходного уровня отсутствуют при $p \leq 0,05$.

Отсюда следует не только очевидный вывод о том, что чем выше температура, тем большие нарушения и/или повреждения она вызывает у растений, но и

то, что тем сильнее (до определенных пределов) со стороны растений «противодействие», которое заключается в том, что организм мобилизует все защитные механизмы, которыми он располагает. Таким образом, с повышением температуры (или продолжительности ее воздействия) сила стресса нарастает и в организме создается все большее «напряжение». При этом по мере повышения температуры стресс из «мягкой» (при 33°) и «средней» (при 37°С) форм переходит в «жесткую» (при 43°С), которая характеризуется значительными нарушениями и/или повреждениями клеток и тканей растений озимой пшеницы, многие из которых носят необратимый характер и ведут к гибели растений. Более того, при «жестком» стрессе часть защитных механизмов, судя по всему, может инактивироваться (например, экспрессия гена *IRE1*), что служит сигналом для активации процессов ПКГ. В частности, возрастает экспрессия генов *BAH.2* и *MCAII*, на фоне которого отмечены признаки развития ПКГ. Таким образом, с повышением интенсивности высокотемпературного воздействия и его продолжительности и, соответственно, с увеличением силы стресса включаются и/или активизируются разные механизмы устойчивости растений, а с достижением критической температуры запускаются процессы ПКГ.

ВЫВОДЫ

1. Воздействие на проростки озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L., с. Московская 39) температур из диапазона 33° – 39°С индуцирует у них повышение теплоустойчивости, при этом по мере увеличения теплоустойчивости усиливается торможение их роста и снижается оводненность листьев. Температуры от 41° до 45°С в начальный момент своего действия также вызывают повышение теплоустойчивости проростков, однако при более продолжительном воздействии (1 ч и более) происходит её быстрое снижение, а температуры 43°С и выше приводят в дальнейшем к повреждению и гибели проростков.
2. Воздействие на проростки озимой пшеницы температур 37° и 43°С вызывает увеличение активности СОД и накопление МДА. Температуры 33°, 37° и 43°С приводят к усилению образования АФК. С повышением температуры стресс из «мягкой» (при 33°) и «средней» (при 37°) форм переходит в «жесткую» (при 43°С), которая характеризуется значительными и необратимыми структурно-функциональными нарушениями и/или повреждениями.
3. В начальный период действия на проростки озимой пшеницы температур 33°, 37° и 43°С (вызывающих «мягкий», «средний» и «жесткий» стресс, соответственно) в их листьях происходит накопление транскриптов генов *HSP70* и *HSP90*, кодирующих белки шапероны. Воздействие на проростки температур 37° и 43°С также вызывает накопление в их листьях транскриптов генов *BiP*, *HSP16,9*, *HSP19*.
4. Воздействие на проростки озимой пшеницы температуры 33°С («мягкий» стресс) приводит к небольшим изменениям в экспрессии генов *IRE1* и *BI-1*. Тем-

пература 37°C («средний» стресс), при которой отмечен максимальный прирост теплоустойчивости проростков, индуцирует наибольшее накопление транскриптов гена *IRE1*. Температура 43°C («жесткий» стресс) в начальный период действия (до 6 ч) в наибольшей степени влияет на содержание транскриптов гена *VI-1*, вызывая значительное увеличение их содержания.

5. Воздействие на проростки озимой пшеницы температур 37° («средний» стресс) и 43°C («жесткий» стресс) вызывает в их листьях фрагментацию ДНК, что является одним из признаков ПКГ.

6. Воздействие на проростки озимой пшеницы температур 33° («мягкий» стресс) и 37° («средний» стресс) не оказывает существенного влияния на экспрессию гена *ВАХ.2*, однако при 43°C («жесткий» стресс) в их листьях происходит резкое усиление накопления транскриптов этого гена, а также транскриптов гена *МСАII*, что указывает на активацию механизмов ПКГ.

7. Из совокупности полученных данных следует, что при субповреждающих температурах («мягкий» и «средний» стрессы) защитные механизмы растений способны в полном объеме справляться с появляющимися в их клетках структурно-функциональными нарушениями, растения в этом случае успешно адаптируются, а их теплоустойчивость возрастает. При повреждающих температурах («жесткий» стресс) защитные механизмы уже не справляются с возникающими при этом многочисленными нарушениями и/или повреждениями, устойчивость растений резко падает и они в конечном итоге погибают.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. **Нилова И.А.**, Титов А.Ф. Динамика теплоустойчивости проростков пшеницы в зависимости от интенсивности высокотемпературного воздействия // Труды КарНЦ РАН, сер. Экспериментальная биология. 2014. № 5. С. 214 – 217
2. **Нилова И.А.**, Топчиева Л.В., Титов А.Ф. Экспрессия генов БТШ пшеницы при действии высоких температур // Труды КарНЦ РАН, сер. Экспериментальная биология. 2015. № 11. С. 55 – 65.
3. Топчиева Л.В., Таланова В.В., Титов А.Ф., **Нилова И.А.**, Репкина Н.С., Венжик Ю.В. Влияние низких и высоких закаливающих и повреждающих температур на уровень транскриптов генов *VI-1* у пшеницы // Труды КарНЦ РАН, сер. Экспериментальная биология. 2015. № 11. С. 55 – 65.
4. Топчиева Л.В., **Нилова И.А.**, Титов А.Ф. Динамика содержания транскриптов генов проапоптотических белков в листьях растений пшеницы при действии высоких неблагоприятных температур // Доклады Академии наук. 2017. Т. 472, № 1. С. 102 – 105.

5. **Нилова И.А.**, Топчиева Л.В., Титов А.Ф. Основные этапы формирования клеточного ответа у растений на высокотемпературные воздействия // Труды КарНЦ РАН, сер. Экспериментальная биология. 2015. №12. С. 3 – 27.
6. **Нилова И.А.**, Титов А.Ф., Топчиева Л.В. Влияние высоких температур на некоторые физиологические показатели и содержание мРНК генов *HSP70*, *BiP*, *IRE1* в листьях пшеницы // Труды КарНЦ РАН, сер. Экспериментальная биология. 2018, №6. С. 40 – 50.

Публикации в других изданиях

7. **Nilova I.A.**, Repkina N.S., Titov A.F., Talanova V.V. Comparative study of moderate cold and heat stress effect on wheat seedlings // Plant abiotic stress tolerance III: Abstracts of International conference (Vienna, 29 of June – 01 of July 2015). Vienna, Austria, 2015. С. 75.
8. **Nilova I.A.**, Topchieva L.V., Titov A.F. The influence of high temperatures of different intensity on gene expression is responsible for programmed cell death development in wheat plants // Proceedings of Fourth International Symposium on Plant Signaling and Behavior (St. Petersburg 19 – 24 June 2016). St. Petersburg, Russia, 2016. P. 113
9. **Нилова И.А.** Топчиева Л.В., Титов А.Ф. Изменение содержания транскриптов генов *TaHSP70*, *TaHSP90* и *BI-1* в листьях проростков пшеницы при действии высоких температур // Годичное собрание общества физиологов растений России. Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма. 21–24 июня 2016, С.-Петербург, Россия / Медведев С.С. Изд-во Санкт-Петербургского государственного университета, 2016. – 245 с.
10. **Нилова И.А.**, Топчиева Л. В. Развитие окислительного стресса в листьях пшеницы под влиянием высоких температур // Сборник материалов докладов Годичного собрания Общества физиологов растений России, научной конференции и школы молодых ученых «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты». 18-24 сентября 2017, Крым, Судак. С. 249.
11. **Нилова И.А.**, Топчиева Л. В. Влияние высокотемпературных воздействий разной интенсивности на теплоустойчивость растений пшеницы и накопление в их листьях транскриптов генов *BiP*, *IRE1*, *BAX.2*, *MCAII* // Клеточная биология и биотехнология растений: тез. докл. II междунар. науч.-прак. конф., Респ. Беларусь, Минск, 28 – 31 мая 2018. С. 69.