

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ФОТОПЕРИОДА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ЗАКАЛИВАНИЯ *Arabidopsis thaliana* Heynh. (L.)

© 2023 г. В. Н. Попов^а, *, А. Н. Дерябин^а

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: vnprov@mail.ru

Поступила в редакцию 18.11.2022 г.

После доработки 07.12.2022 г.

Принята к публикации 07.12.2022 г.

Исследовали влияние продолжительности фотопериода на эффективность низкотемпературного закаливания растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., экотип Col-0. Закаливание 6-недельных растений проводили при температуре 2°C в течение 1–5 сут., используя фотопериоды 0, 8 и 16 ч (освещенность 200 мкмоль/(м² с)). Показано, что растения, подвергнутые закаливанию в темноте, не были устойчивы к морозу, согласно данным по выживаемости и выходу электролитов после тестирующего промораживания (–6°C, 1 сут.). Растения, закаленные на свету (независимо от фотопериода), к концу периода закаливания значительно повысили свою морозоустойчивость. Отношение видимый фотосинтез/темновое дыхание у этих растений было почти в два раза выше, чем в контроле (без закаливания). Вариант с 16-часовым фотопериодом превосходил вариант с 8-часовым освещением, как по максимальным уровням накопления сахаров (почти на 40%), так и по скорости достижения этих уровней в посуточной динамике закаливания. Показано транзиторное увеличение содержания МДА в первые сутки закаливания на свету и отсутствие изменений в содержании МДА при закаливании в темноте, что может свидетельствовать о сигнальной функции продуктов перекисного окисления липидов при закаливании. Установлено влияние продолжительности фотопериода на скорость формирования устойчивости растений *A. thaliana* к морозу. Более длительная работа фотосинтетического аппарата *A. thaliana* при 16 ч фотопериоде значительно повышала скорость накопления сахаров при закаливании и, соответственно, скорость формирования устойчивости к морозу по сравнению с 8 ч фотопериодом. Заключено, что для быстрого формирования повышенной устойчивости *A. thaliana* к морозу требуется сочетание низкой положительной температуры и 16-часового фотопериода.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, низкотемпературное закаливание, перекисное окисление липидов, сахара, фотопериод, фотосинтез

DOI: 10.31857/S0015330322600619, **EDN:** IASUAI

ВВЕДЕНИЕ

Среди абиотических стрессоров низкая температура является одним из важнейших экологических факторов, ограничивающих продуктивность и географическое распространение растений [1]. В контексте глобального изменения климата частота неблагоприятных погодных явлений, таких как низкие положительные и отрицательные температуры, возрастает, что серьезно ограничивает сельскохозяйственное производство [2]. Чтобы противостоять повреждающему действию отрицательных температур, растения умеренного климата обладают способностью повышать свою морозоустойчи-

вость в ответ на действие низких положительных температур. Этот процесс известен как низкотемпературное закаливание (cold hardening/cold acclimation) [3]. Закаливание затрагивает практически все физиологические и биохимические процессы растений, а также вызывает значительные изменения в экспрессии генов, отвечающих за синтез белков, участвующих в формировании устойчивости к морозу [4, 5]. Установлено, что для каждого вида растений существуют соответствующие генотипу условия закаливания, которые включают такие параметры как температура окружающей среды, длина дня, интенсивность освещения и продолжительность закаливания.

В природных условиях низкотемпературное закаливание происходит осенью при низких положительных температурах и обеспечивает сезон-

Сокращения: МДА – малоновый диальдегид, ПОЛ – перекисное окисление липидов, ЭТЦ – электрон-транспортная цепь.

ное выживание озимых и многолетних растений при отрицательных температурах в зимний период. Закаливание часто связывают с уменьшением фотопериода, что инициирует прекращение роста растений и создает условия для его эффективного прохождения. Для древесных растений уменьшение длины дня в осенний период является обязательным условием для формирования повышенной устойчивости к морозу [6, 7]. Роль фотопериода в закаливании травянистых растений не столь очевидна. Так, в работе Wanner и Junttila было показано, что наименьший прирост устойчивости к морозу у *A. thaliana* наблюдался при закаливании (2°C) на коротких световых периодах (3 и 6 ч), тогда как максимальная морозоустойчивость формировалась при использовании более длительных световых периодов (12 и 16 ч) [8]. Согласно другим авторам, морозоустойчивость растений *A. thaliana* в условиях короткого дня (8 ч) была выше, чем в условиях длинного дня (16 ч) [9].

Широко известна работа Труновой [10] по исследованию влияния светового режима при закаливании на морозостойкость озимой пшеницы. В этой работе было показано, что устойчивости к морозу озимой пшеницы можно повысить как на коротком, так и на непрерывном дне. При круглосуточном освещении высокая морозостойкость достигалась после первой недели закаливания, а на коротком световом дне (8 ч) аналогичная устойчивость развивалась к концу третьей недели закаливания.

В связи с этим цель нашей работы заключалась в исследовании влияния продолжительности фотопериода при низкотемпературном закаливании на посуточную динамику формирования морозоустойчивости растений, уделяя внимание не только фотосинтетической, но и сигнальной роли света в этом процессе. Для этого мы использовали вид *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (экотип Col-0), который является общепризнанным модельным организмом для изучения молекулярных и физиологических механизмов, лежащих в основе адаптации растений к низким температурам [11].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. Объектами исследования являлись растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., экотип Col-0. Растения выращивали в вазонах с почвой в камерах фитотрона ИФР РАН при следующих условиях: температура 22°C, 8-часовой фотопериод и освещенность 200 мкмоль/(м² с). Выбор 8-часового режима светового дня для *A. thaliana* обусловлен тем, что он относится к длиннодневным растениям и при использовании короткого дня достигает необходимой для исследований биомассы розетки, не переходя в фазу цветения. Для опытов использовали растения в возрасте 6 недель. Закаливание растений проводили в

климатической камере KBW-240 (“Binder”, Германия) при температуре 2°C. Во время закаливания применялись различные режимы освещения растений: без освещения (фотопериод 0 ч), освещение 8 ч при 200 мкмоль/(м² с) (фотопериод 8 ч), освещение 16 ч при 200 мкмоль/(м² с) (фотопериод 16 ч). Длительность закаливания варьировала от 1 до 5 сут. В качестве контроля использовали растения, не подвергнутые воздействию закаливающих процедур.

Определение устойчивости растений к низкой температуре. Устойчивость растений *A. thaliana* к низкой температуре оценивали с помощью метода прямого промораживания. Для этого незакаленные и закаленные в течение 1–5 сут. растения переносили на 1 сут. в климатическую камеру MIR-153 (“Sanyo”, Япония) с температурой –6°C. Данный режим промораживания, подобранный в ходе предварительных опытов, приводит к гибели всех незакаленных растений *A. thaliana* и позволяет достоверно оценивать эффективность закаливания. После промораживания растения переносили в оптимальные для вегетации условия на одну неделю. Выживаемость рассчитывали, как число выживших растений в % от общего количества растений подвергнутых промораживанию.

Степень морозоустойчивости незакаленных и закаленных растений *A. thaliana* также оценивали по выходу электролитов из листовой ткани в водную фазу. Электропроводность водных экстрактов определяли при помощи кондуктометра SG7-ELK (“Mettler Toledo”, Швейцария). Выход электролитов из тканей листьев (*V*, в %) рассчитывали по формуле:

$$V = 100 \times (L_o/L_k),$$

где L_o – электропроводность исследуемого образца до или после низкотемпературной экспозиции и L_k – электропроводность того же образца после кипячения [12].

CO₂-газообмен растений. Определение параметров CO₂-газообмена растений *A. thaliana* проводили на установке открытого типа с инфракрасным газоанализатором URAS 2T (“Hartmann & Braun”, Германия) при 22°C (контроль) и 2°C (закаленные растения), т. е. при температурах, идентичных температурам вегетации и холодого закаливания. Измерения газообмена включали определение скорости видимой ассимиляции CO₂ и темнового дыхания, которые выражали в мг CO₂/г сухой массы ч. На основе этих параметров рассчитывали отношение видимый фотосинтез/темновое дыхание [13].

Определение содержания сахаров. Навески листьев *A. thaliana* (~500 мг) фиксировали 96% кипящим этанолом. Далее ткань гомогенизировали и сахара извлекали трехкратной экстракцией 80% этанолом. В полученных экстрактах определяли

содержание глюкозы – глюкозооксидазным методом, сахарозы и фруктозы – по методу Рое [14]. Полученные результаты выражали в мг/г сухой массы.

Определение содержания малонового диальдегида (МДА). Об интенсивности процессов ПОЛ судили по накоплению одного из продуктов окисления – МДА. Содержание МДА определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой. Навеску листьев (300 мг) гомогенизировали в 5 мл среды выделения (0.1 М трисНСI буфер, рН 7.6, содержащий 0.35 М NaCl). К 3 мл гомогената добавляли 2 мл 0.5% тиобарбитуровой кислоты в 20% трихлоруксусной кислоте, инкубировали при 95°C в течение 30 мин., охлаждали, фильтровали и регистрировали оптическую плотность при длине волны 532 нм. В качестве контроля использовали среду выделения с реагентом. Содержание малонового диальдегида рассчитывали в мкмоль/г сухой массы [15].

Статистическая обработка данных. Во всех экспериментах биологическая повторность измерений была 10-кратной, аналитическая 3–4-кратной. Каждый эксперимент повторяли не менее 3 раз. Результаты экспериментов обработаны статистически с помощью программы SigmaPlot 12.3. На гистограммах и в таблицах представлены средние значения и их стандартные ошибки. Достоверность различий между средними значениями оценена по *t*-критерию Стьюдента для 95% уровня значимости ($P < 0.05$). Достоверно различающиеся между собой величины обозначены разными надстрочными латинскими буквами.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В таблицах 1 и 2 представлены результаты экспериментов по изучению влияния продолжительности фотопериода (0, 8 и 16 ч) во время низкотемпературного закаливания на выживаемость растений *A. thaliana* и проницаемость их клеточных мембран после суточного тестирующего промораживания при температуре –6°C. Из полученных данных по выживаемости (табл. 1) видно, что после промораживания контрольные растения (без закаливания) и все растения, прошедшие закаливание в отсутствие света, погибли. Число растений, выживших после промораживания, возросло с увеличением продолжительности фотопериода, начиная с первых суток закаливания. Однако при использовании 16-часового фотопериода выживаемость растений после тестирующего промораживания на протяжении всего периода закаливания была 100%, тогда как при 8-часовом фотопериоде этот показатель был максимальным только после 3 сут. закаливания (табл. 1).

После промораживания растений *A. thaliana* выход электролитов, являющийся показателем степени целостности клеточных мембран, зави-

Таблица 1. Влияние продолжительности фотопериода при закаливании на выживаемость растений *A. thaliana* после промораживания при температуре –6°C в течение 1 сут.

Длительность закаливания, сут.	Выживаемость, %		
	продолжительность фотопериода, ч		
	0	8	16
Без закаливания	0 ^d	0 ^d	0 ^d
1	0 ^d	25 ± 4 ^c	100 ^a
2	0 ^d	65 ± 7 ^b	100 ^a
3	0 ^d	100 ^a	100 ^a
4	0 ^d	100 ^a	100 ^a
5	0 ^d	100 ^a	100 ^a

Примечание. В таблице величины, достоверно различающиеся при $P < 0.05$, обозначены разными надстрочными латинскими буквами.

Таблица 2. Влияние продолжительности фотопериода при закаливании на выход электролитов из листьев растений *A. thaliana* после промораживания при температуре –6°C в течение 1 сут.

Длительность закаливания, сут.	Выход электролитов, %		
	продолжительность фотопериода, ч		
	0	8	16
Без закаливания	91 ± 4 ^a	91 ± 4 ^a	91 ± 4 ^a
1	90 ± 5 ^a	54 ± 4 ^b	40 ± 3 ^c
2	88 ± 5 ^a	45 ± 3 ^{bc}	27 ± 3 ^d
3	91 ± 5 ^a	32 ± 3 ^d	25 ± 2 ^d
4	83 ± 4 ^a	26 ± 4 ^d	26 ± 4 ^d
5	82 ± 5 ^a	24 ± 3 ^d	25 ± 3 ^d

Примечание. В таблице величины, достоверно различающиеся при $P < 0.05$, обозначены разными надстрочными латинскими буквами.

сел от продолжительности фотопериода и длительности закаливания (табл. 2). У контрольных растений (без закаливания), а также у растений, закаленных без освещения (независимо от длительности закаливания), выход электролитов был очень высоким и варьировал от 82 до 91%, что свидетельствовало о необратимых нарушениях в структуре и функциях мембран и гибели клеток листьев. Наличие в период низкотемпературного закаливания света способствовало резкому снижению величины выхода электролитов после промораживания растений, что указывало на сохранение структурно-функционального состояния клеточных мембран.

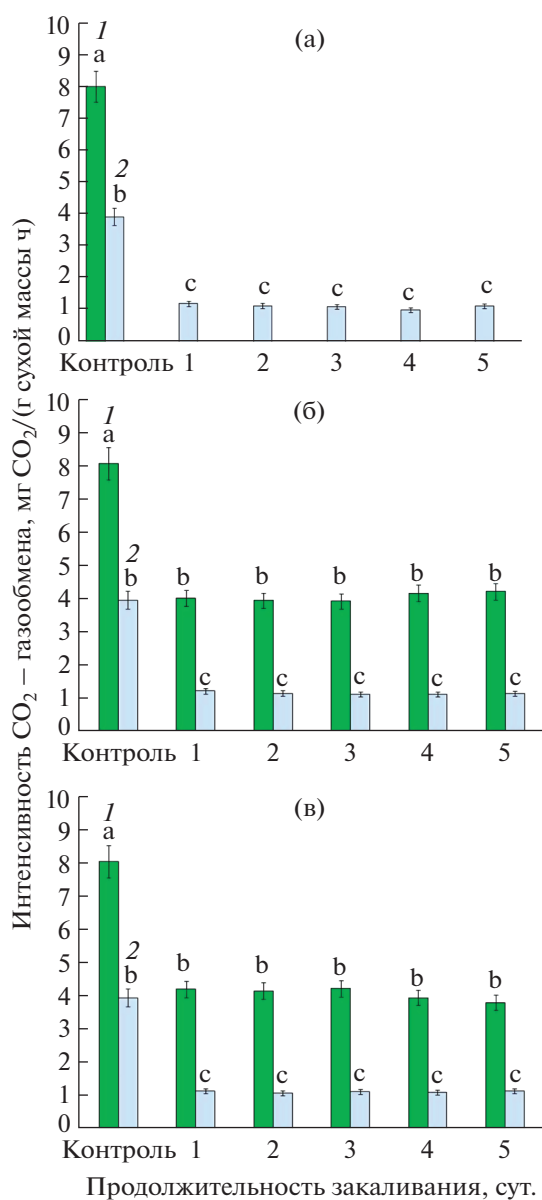


Рис. 1. Изменение параметров CO₂-газообмена растений *A. thaliana* при закаливании в условиях фотопериодов различной продолжительности: (а) – 0 ч, (б) – 8 ч, (в) – 16 ч. 1 – видимый фотосинтез; 2 – темновое дыхание. Достоверные различия средних значений при $P < 0.05$ отмечены разными латинскими буквами над барами.

Так, у растений после 1 сут. закаливании на 8- и 16-часовом фотопериоде и последующего тестирующего промораживания выход электролитов из тканей листьев существенно снижался, по сравнению с растениями, не подвергавшимися закаливанию (контроль). В дальнейшем, при обоих вариантах фотопериода с увеличением длительности закаливании величина выхода электролитов продолжала снижаться и после 5 сут. составляла 24–25% (табл. 2).

Одним из интегральных физиологических показателей растений, реагирующих на изменение температуры, является CO₂-газообмен. В период низкотемпературного закаливании при различной продолжительности фотопериода у растений *A. thaliana* были определены параметры CO₂-газообмена, такие как, видимый фотосинтез и темновое дыхание, а также рассчитано отношение видимый фотосинтез/темновое дыхание. Результаты показали, что при закаливании растений интенсивность темнового дыхания снижалась почти в три раза, независимо от продолжительности фотопериода (рис. 1). На протяжении всего периода закаливании в темноте видимый фотосинтез у растений не регистрировался (рис. 1а). При 8- и 16-часовом фотопериоде интенсивность видимого фотосинтеза снизилась примерно в два раза, по сравнению с контролем (без закаливании), но оставалась значительно выше, чем интенсивность темнового дыхания (рис. 1б, в). Отношение видимый фотосинтез/темновое дыхание у растений при закаливании на 8- и 16-часовом фотопериоде было почти в два раза выше, чем в контроле.

Продолжительность фотопериода при низкотемпературном закаливании растений *A. thaliana* оказало существенное влияние на содержание сахаров (фруктозы, глюкозы, сахарозы) в листьях. Из данных, представленных на рис. 2 видно, что при отсутствии освещения в период закаливании содержание каждой из этих форм сахаров в листьях не претерпевало достоверных изменений, оставаясь на уровне контроля (без закаливании). Наличие 8- и 16-часового фотопериода приводило к резкому накоплению сахаров, преимущественно, в форме глюкозы, особенно в первые трое суток закаливании, в дальнейшем уровень всех форм сахаров выходил на плато. По сравнению с контролем, на 5 сут. закаливании растений при 8- и 16-часовом фотопериоде содержание фруктозы в листьях увеличилось в 19.1 и 21.3 раз, глюкозы – в 10.5 и 15.6 раз, сахарозы – в 2.0 и 2.5 раз, соответственно. Суммарное содержание сахаров в листьях за период низкотемпературного закаливании растений при 16-часовом фотопериоде было больше на 10 мг/г сухой массы, по сравнению с 8-часовым. При этом накопление сахаров происходило более интенсивно при использовании 16-часового фотопериода, чем 8-часового.

На протяжении всего периода закаливании растений в темноте содержание МДА – одного из конечных продуктов ПОЛ, не изменялось (рис. 3). Наличие 8- и 16-часового фотопериода способствовало накоплению МДА в листьях, но только в 1 сут. закаливании. В дальнейшем содержание МДА в обоих вариантах было на уровне контроля (без закаливании).

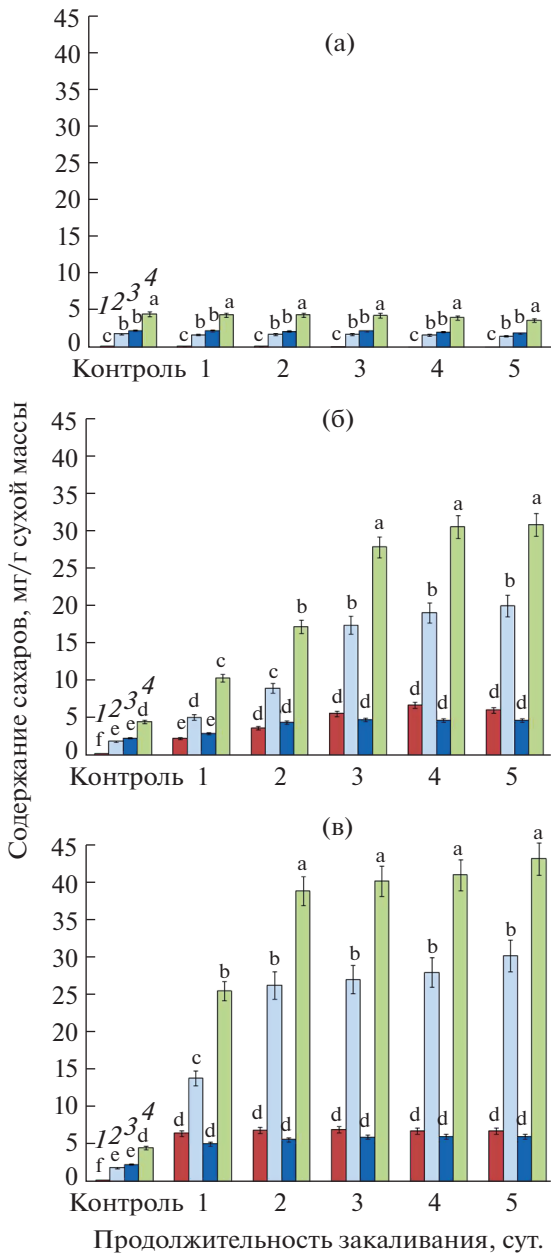


Рис. 2. Изменение содержания сахаров в листьях *A. thaliana* при закаливании растений в условиях фотопериодов различной продолжительности: (а) – 0 ч, (б) – 8 ч, (в) – 16 ч. 1 – фруктоза; 2 – глюкоза; 3 – сахароза; 4 – сумма сахаров. Достоверные различия средних значений при $P < 0.05$ отмечены разными латинскими буквами над барами.

ОБСУЖДЕНИЕ

Закаливание необходимо для формирования повышенной устойчивости растений к морозу, позволяющей выдерживать более низкие отрицательные температуры по сравнению с незакаленными растениями [11]. Для оценки эффективности процесса закаливания наиболее часто используются метод прямого промораживания целых растений

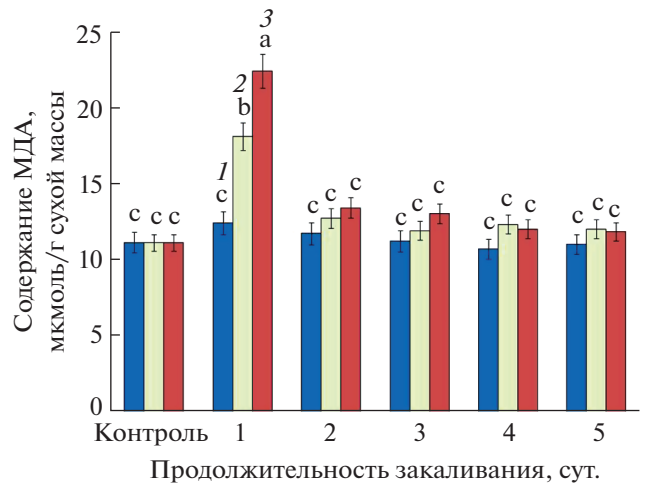


Рис. 3. Изменение содержания МДА в листьях *A. thaliana* при закаливании растений в условиях фотопериодов различной продолжительности. 1 – 0 ч; 2 – 8 ч; 3 – 16 ч. Достоверные различия средних значений при $P < 0.05$ отмечены разными латинскими буквами над барами.

с последующей оценкой их выживаемости, а также измерение величины выхода электролитов из листовой ткани в водную фазу. Оба метода дают достоверные результаты оценки степени повреждения растений низкими температурами и широко применяются в научных исследованиях [16].

Полученные нами данные подтвердили чрезвычайно важную роль света в закаливании растений *A. thaliana*. Опыты показали, что растения *A. thaliana*, подвергнутые закаливанию в темноте не смогли сформировать устойчивость к морозу, согласно данным по выживаемости и выходу электролитов после промораживания (-6°C , 1 сут.), т.е. они не отличались от незакаленных растений. В то же время, растения *A. thaliana* закаленные на свету разной продолжительности (8 ч и 16 ч) к концу периода низкотемпературного закаливания (5 сут.) значительно повысили свою устойчивость к морозу. На 5 сут. закаливания величина выхода электролитов и показатели выживаемости растений при обоих вариантах используемого фотопериода практически не отличались. Нужно отметить, что продолжительность фотопериода при закаливании влияла на скорость формирования устойчивости к морозу. Если при 8-часовом фотопериоде 100% уровень выживаемости тестируемых растений достигался после 3 сут. закаливания, то при 16-часовом фотопериоде 100% промороженных растений выживали уже после первых суток низкотемпературного закаливания.

Совместное действие низких положительных температур и света имеет важнейшее значение для эффективного закаливания растений [17]. Наиболее очевидной ролью света в процессе за-

каливания является фотосинтетическая фиксация углерода, которая необходима для обеспечения растений энергией и субстратами для синтеза веществ с защитным эффектом [3]. В наших экспериментах все растения *A. thaliana*, закаливающиеся на свету, сохраняли фотосинтетическую активность. Интенсивность видимого фотосинтеза растений при закаливающих температурах снижалась в 2 раза, по сравнению с незакаленными растениями независимо от продолжительности фотопериода.

Важной особенностью CO_2 -газообмена растений *A. thaliana* являлось то, что интенсивность видимого фотосинтеза при закаливании уменьшалась в меньшей степени, чем интенсивность темнового дыхания. Это приводило к 1.6–1.9 кратному увеличению отношения видимый фотосинтез/темновое дыхание в посуточной динамике закаливания, что является предпосылкой накопления большого количества продуктов фотосинтеза в условиях закаливающих температур [13]. Действительно, наши исследования показали многократное увеличение содержания сахаров, преимущественно в форме глюкозы, в динамике закаливания *A. thaliana* на свету различной продолжительности и отсутствие прироста содержания сахаров при закаливании в темноте. Эти результаты хорошо согласуются с данными по устойчивости растений *A. thaliana* к морозу (табл. 1, 2) и могут объяснять большие различия в эффективности их закаливания на свету и в темноте. Отсутствие фотосинтеза и его продуктов – сахаров не позволило растениям *A. thaliana* повысить свою устойчивость к морозу (-6°C , 1 сут.) даже при использовании низких положительных температур. Вариант с 16-часовым фотопериодом превосходил вариант с 8-часовым освещением, как по максимальным уровням накопления сахаров (почти на 40%), так и по скорости достижения этих уровней в посуточной динамике закаливания. При этом следует отметить, что различия в максимальных уровнях содержания сахаров к концу периода закаливания (~ 40 мг/г сухой массы при 16-часовом фотопериоде и ~ 30 мг/г сухой массы при 8-часовом фотопериоде) не приводили к существенным различиям в устойчивости *A. thaliana* к морозу. 100% уровень выживаемости замороженных растений *A. thaliana* формировался при достижении содержания сахаров ~ 25 мг/г сухой массы. Данная величина по содержанию сахаров достигалась уже после 1 сут. закаливания при 16-часовом фотопериоде и после 3 сут. закаливания при 8-часовом фотопериоде, что оказывало влияние на скорость формирования устойчивости *A. thaliana* к морозу.

Известно, что при отрицательных температурах происходит замерзание воды в тканях растений, что приводит к их повреждению и даже гибели. Лед может образовываться внутри клетки, что всегда приводит к ее гибели, а также в межклетниках. Внеклеточное образование льда позволяет

сохранить жизнеспособность клеток, но вызывает их обезвоживание [18]. Поэтому стратегия закаливания растений к морозу базируется на избегании возникновения льда внутри клетки и повышении их устойчивости к межклеточному льду [3]. Реализация этой стратегии критически зависит от содержания сахаров, которые накапливаются в растениях во время низкотемпературного закаливания и выполняют стресс-протекторную функцию. Многократное увеличение содержания сахаров повышает осмотический потенциал клетки, что позволяет снижать температуру образования внутриклеточного льда и повышать устойчивость клеток к обезвоживанию [19]. Кроме того, сахара участвуют в метаболических процессах в качестве источника энергии и предшественников синтеза других соединений – криопротекторов, а также стабилизируют структуру мембран, молекул липидов и белков [20].

Помимо фотосинтетической роли, свет также может играть сигнальную роль при закаливании, которая, по-видимому, опосредована генерацией АФК и накоплением продуктов ПОЛ. При низких положительных температурах, необходимых для закаливания, скорость переноса электронов по электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) хлоропластов может быть избыточной по сравнению со скоростью ферментативных реакций цикла Кальвина. Это может приводить к перевосстановленности компонентов ЭТЦ хлоропластов и провоцировать значительное увеличение скорости генерации АФК и продуктов ПОЛ [21, 22]. В нашей работе, интенсивность ПОЛ в динамике закаливания была определена по содержанию одного из конечных продуктов процесса – МДА, который рассматривается как маркер окислительного стресса [23]. В течение всего периода закаливания *A. thaliana* в темноте, содержание МДА оставалось стабильным, что свидетельствует об отсутствии развития окислительного стресса при отсутствии низкой положительной температуры в отсутствие света. Напротив, в вариантах с 8- и 16-часовым фотопериодами наблюдался существенный – в 1.7 и в 2 раза, соответственно, рост содержания МДА в 1 сут. закаливания с последующим снижением до уровня контрольных значений. Отчетливо выраженный транзиторный характер изменения содержания МДА в листьях *A. thaliana*, а также высокая эффективность низкотемпературного закаливания на свету различной продолжительности, может свидетельствовать о сигнальной роли продуктов ПОЛ в первые сутки закаливания. Известно, что реализация сигнальной функции АФК и продуктов ПОЛ может осуществляться через регуляцию кальциевого статуса клеток путем влияния на интенсивность поступления ионов Ca^{2+} , как второго мессенджера, в цитозоль [24] и последующего фосфорилирования сигнальных белков [25], а также через изменение потенциала редокс-чув-

ствительных клеточных систем [21]. Кроме того, в ответ на рост АФК и продуктов ПОЛ, в клетке изменяется экспрессия генов, кодирующих антиоксидантные ферменты (СОД, аскорбатпероксидазы, каталазы), и происходит их синтез *de novo*, а также возрастает уровень неферментативных антиоксидантов (глутатиона, аскорбата, флавоноидов, токоферолов) [26]. На основании полученных нами данных можно предположить, что за счет активации антиоксидантных защитных систем снижался уровень АФК и интенсивность ПОЛ в клетках *A. thaliana* уже начиная со 2 сут. закаливания в вариантах с 8- и 16-часовым фотопериодами. Возможность избежать окислительное повреждение при сохранении фотосинтетической активности растений, по-видимому, являлось одним из важных условий высокой эффективности низкотемпературного закаливания *A. thaliana*.

В литературе имеются данные о том, что сигнальная роль света при закаливании растений к морозу также может осуществляться при помощи фитохромов и заключается в положительной регуляции экспрессии индуцированных холодом генов. Было показано, что закаливание растений *A. thaliana* на свету активировало в два раза больше генов, по сравнению с закаливанием в темноте [27]. Анализ экспрессии генов *A. thaliana* показал, что фитохромы участвуют в светоопосредованной передаче сигналов для активации экспрессии большого количества генов, включая гены *CBF1-3* [28]. Факторы транскрипции CBF1-3 в свою очередь контролируют устойчивость растений к холодовому стрессу, регулируя экспрессию генов холодового ответа (*COR*) [29, 30]. *COR*-гены быстро индуцируются в ответ на низкие температуры и играют значительную роль в развитии устойчивости растений к морозу. К числу основных продуктов *COR*-генов относятся ферменты биосинтеза осмопротекторов, белки позднего эмбриогенеза (LEA), протеинкиназы, а также белки, связанные с метаболизмом липидов и модификациями клеточной стенки. Накопление данных веществ способно существенно повысить устойчивость растительных клеток к морозу [31].

Таким образом, на основе литературных и экспериментальных данных можно констатировать, что для формирования повышенной устойчивости *A. thaliana* к морозу требуется сочетание низкой положительной температуры и света, который при закаливании выполняет фотосинтетическую и сигнальную функции. Успех низкотемпературного закаливания растений зависит от взаимодействия между световыми и низкотемпературными сигналами, которые участвуют в регуляции этого процесса [17]. Основываясь на результатах наших экспериментов, можно предположить, что опосредованная через генерацию АФК и накопление продуктов ПОЛ сигнальная функция света имеет важное значение для запуска процесса низкотем-

пературного закаливания. В пользу этого предположения свидетельствуют установленное транзитное увеличение содержания МДА в первые сутки закаливания на свету и отсутствие изменений в содержании МДА при закаливании в темноте.

Не отрицая важность сигнальной функции, мы считаем, что эффективность низкотемпературного закаливания *A. thaliana*, главным образом, определялась фотосинтетической функцией света. Наши эксперименты показали, что продолжительность фотопериода не имеет для закаливания *A. thaliana* такого принципиального значения, как для древесных растений [6]. Растения *A. thaliana* были способны развивать повышенную устойчивость к морозу при закаливании как на коротком фотопериоде (8 ч), так и на длинном (16 ч). Продолжительность фотопериода оказывала влияние не столько на способность к формированию повышенной морозоустойчивости растений, сколько на скорость формирования такой устойчивости. Более длительная работа фотосинтетического аппарата *A. thaliana* при 16 ч фотопериоде значительно повышала скорость накопления сахаров при закаливании и, соответственно, скорость формирования устойчивости к морозу по сравнению с 8 ч фотопериодом. Следовательно, эффективность закаливания растений *A. thaliana* зависит от продолжительности функционирования процесса фотосинтеза и, соответственно, от скорости накопления продуктов фотосинтеза – сахаров в условиях действия низких положительных температур.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122042700044-6).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nievola C.C., Carvalho C.P., Carvalho V., Rodrigues E. Rapid responses of plants to temperature changes // *Temperature*. 2017. V. 4. P. 371. <https://doi.org/10.1080/23328940.2017.1377812>
2. Larcher W. *Physiological Plant Ecology. Ecophysiology and stress physiology of functional groups*. Springer: Berlin, Heidelberg, New York, 2003. P. 513.
3. Трунова Т.И. Растение и низкотемпературный стресс. 64-е Тимирязевские чтения. М.: Наука, 2007. 54 с.
4. Theocharis A., Clement C., Barka E.A. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures // *Planta*. 2012. V. 235. P. 1091. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1641-y>
5. Rihan H.Z., Al-Issawi M., Fuller M.P. Advances in physiological and molecular aspects of plant cold tolerance // *J. Plant Interact*. 2017. V. 12. P. 143. <https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1308568>

6. Weiser C.J. Cold resistance and injury in woody plants: Knowledge of hardy plant adaptations to freezing stress may help us to reduce winter damage // *Science*. 1970. V. 169. P. 1269. <https://doi.org/10.1126/science.169.3952.1269>
7. Maurya J.P., Bhalerao R.P. Photoperiod and temperature mediated control of growth cessation and dormancy in trees: a molecular perspective // *Ann. Bot.* 2017. V. 120. P. 351. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx061>
8. Wanner L.A., Junttila O. Cold-Induced Freezing Tolerance in *Arabidopsis* // *Plant Physiology*. 1999. V. 120. P. 391. <https://doi.org/10.1104/pp.120.2.391>
9. Lee C.M., Thomashow M.F. Photoperiodic regulation of the C-repeat binding factor (CBF) cold acclimation pathway and freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* // *PNAS*. 2012. V. 109. P. 15054. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211295109>
10. Трунова Т.И. Световой и температурный режимы при закаливании озимой пшеницы и значение олигосахаридов для морозостойкости // *Физиология растений*. 1965. Т. 12. С. 85.
11. Xin Z., Browse J. Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures // *Plant Cell Environ.* 2000. V. 23. P. 893. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00611.x>
12. Campos P.S., Quartin V., Ramalho J.C., Nunes M.A. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants // *J. Plant Physiol.* 2003. V. 160. P. 283. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00833>
13. Klimov S.V., Astakhova N.V., Trunova T.I. Changes in Photosynthesis, Dark Respiration Rates and Photosynthetic Carbon Partitioning in Winter Rye and Wheat Seedlings during Cold Hardening // *J. Plant Physiol.* 1999. V. 155. P. 734.
14. Туркина М.В., Соколова С.В. Методы определения моносахаридов и олигосахаридов // *Биохимические методы в физиологии растений* / Под ред. Павлиновой О.А. М.: Наука, 1971. 7 с.
15. Heath R.L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // *Arch Biochem. Biophys.* 1968. V. 125. P. 189. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
16. Zuther E., Schulz E., Childs L.H., Hinch D.K. Clinal variation in the non-acclimated and cold-acclimated freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* accessions // *Plant Cell Environ.* 2012. V. 35. P. 1860. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02522.x>
17. Catala R., Medina J., Salinas J. Integration of low temperature and light signaling during cold acclimation response in *Arabidopsis* // *PNAS*. 2011. V. 108. P. 16475. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107161108>
18. Ashworth E.N., Pearce R.S. Extracellular freezing in leaves of freezing-sensitive species // *Planta*. 2002. V. 214. P. 798. <https://doi.org/10.1007/s00425-001-0683-3>
19. Reyes-Diaz M., Ulloa N., Zuniga-Feest A., Gutierrez A., Gidekel M., Alberdi M., Corcuera L.J., Bravo L.A. *Arabidopsis thaliana* avoids freezing by supercooling // *J. Exp. Bot.* 2006. V. 57. P. 3687. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl125>
20. Deryabin A.N., Trunova T.I. Colligative effects of solutions of low-molecular sugars and their role in plants under hypothermia // *Biol Bull Russ Acad Sci*. 2021. V. 48. P. 29. <https://doi.org/10.1134/S1062359021060042>
21. Kreslavski V.D., Los D.A., Allakhverdiev S.I., Kuznetsov V.V. Signaling role of reactive oxygen species in plants under stress // *Russ. J. Plant Physiol.* 2012. V. 59. P. 141. <https://doi.org/10.1134/S1021443712020057>
22. Foyer C.H., Noctor G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation and practical implications // *Antioxid. Redox Signal.* 2009. V. 11. P. 861. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2177>
23. Shulaev V., Oliver D.J. Metabolic and proteomic markers for oxidative stress. New tools for reactive oxygen species research // *Plant Physiol.* 2006. V. 141. P. 367. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077925>
24. Mori I.C., Schroeder J.I. Reactive Oxygen Species Activation of Plant Ca²⁺ Channels: A Signaling Mechanism in Polar Growth, Hormone Transduction, Stress Signaling, and Hypothetically Mechanotransduction // *Plant Physiol.* 2004. V. 135. P. 702. <https://doi.org/10.1104/pp.104.042069>
25. Pitzschke P., Hirt H. Mitogen Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species Signaling in Plants // *Plant Physiol.* 2006. V. 141. P. 351. <https://doi.org/10.1104/pp.106.079160>
26. Foyer C.H., Noctor G. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses // *Plant Cell*. 2005. V. 17. P. 1866. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.033589>
27. Soitamo A.J., Piippo M., Allahverdiyeva Y., Battchikova N., Aro E.M. Light has a specific role in modulating *Arabidopsis* gene expression at low temperature // *BMC Plant Biology*. 2008. V. 8. P. 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-13>
28. Kim H.J., Kim Y.K., Park J.Y., Kim J. Light signalling mediated by phytochrome plays an important role in cold-induced gene expression through the C-repeat/dehydration responsive element (C/DRE) in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* 2002. V. 29. P. 693. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2002.01249.x>
29. Crosatti C., Polverino de Lauro P., Bassi R., Cattivelli L. The interaction between cold and light controls the expression of the cold-regulated barley gene cor14b and the accumulation of the corresponding protein // *Plant Physiol.* 1999. V. 119. P. 671. <https://doi.org/10.1104/pp.119.2.671>
30. Zhang R., Gonze D., Hou X., You X., Goldbeter A. A computational model for the cold response pathway in plants // *Frontiers in physiology*. 2020. V. 11. e591073. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.591073>
31. Zhao C., Zhang Z., Xie S., Si T., Li Y., Zhu J.K. Mutational evidence for the critical role of CBF transcription factors in cold acclimation in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2016. V. 171. P. 2744. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00533>