

УДК 581.1

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТОВ ДЛИТЕЛЬНОГО ПОСТОЯННОГО И КРАТКОВРЕМЕННЫХ ЕЖЕСУТОЧНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА ОСНОВНЫЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ПОДАВЛЕННОГО БИОСИНТЕЗА БЕЛКОВ

© 2019 г. Е. Г. Шерудило¹, Т. Г. Шибаева^{1, *}, Е. Н. Икконен¹, А. Ф. Титов¹

¹Институт биологии КарНЦ РАН, Россия 185910 Петрозаводск, Пушкинская, 11

*E-mail: shibaeva@krc.karelia.ru

Поступила в редакцию 15.03.2018 г.

После доработки 13.09.2018 г.

Принята в печать 01.10.2018 г.

С помощью ингибиторов синтеза белка на 80S (циклогексимид, ЦГ) и 70S (хлорамфеникол, ХФ) рибосомах исследовали роль белоксинтезирующей системы в ответной реакции теплолюбивого (огурец) и холодостойкого (пшеница) видов растений на действие постоянной низкой температуры (ПНТ, 12°C для огурца и 4°C для пшеницы) и кратковременных ежесуточных понижений температуры (ДРОП, от англ. *drop* – падение, на 2 ч в конце ночи до 12°C для огурца и до 4°C для пшеницы). Указанные ингибиторы тормозили рост листьев у растений контрольного варианта (постоянно находившихся при 23°C) и в вариантах с ДРОП-воздействиями, и ПНТ. Оба ингибитора также снижали скорость видимого фотосинтеза, транспирации, темнового дыхания и накопления хлорофилла во всех вариантах опыта, но наиболее ощутимо – в контроле и варианте с ДРОП-воздействиями. Результаты подтвердили ранее установленную зависимость формирования повышенной холодоустойчивости у растений, находящихся в условиях постоянного действия низкой субповреждающей температуры (вариант ПНТ), от биосинтеза белка на 70S и особенно на 80S рибосомах, а также впервые продемонстрировали участие белоксинтезирующей системы в повышении холодоустойчивости растений, наблюдаемом при кратковременных ежесуточных понижениях температуры (вариант ДРОП), которые сравнительно часто наблюдаются в естественных условиях и в качестве агротехнического приема используются в тепличном производстве как альтернатива применению ретардантов. Однако из полученных данных следует, что во втором случае повышенный уровень холодоустойчивости растений (формируемый под влиянием ДРОП-воздействий) обеспечивается не только за счет биосинтеза белков *de novo*, но и благодаря активации адаптационных механизмов, которые действуют на посттрансляционном уровне.

DOI: 10.1134/S0044459619010056

Известно, что процесс холодовой адаптации растений находится под молекулярно-генетическим контролем, связанным с дифференциальной активностью генов и механизмом индуцированного синтеза белков (Guy, 1990; Thomashow, 1999, 2001; Browse, Xin, 2001). Низкие субповреждающие температуры подавляют экспрессию большинства генов, функционирующих в норме, и индуцируют экспрессию генов, кодирующих синтез стрессовых (шоковых) белков, которые участвуют не только в изменении метаболизма растений в этих условиях, но и в повышении их устойчивости, выполняя протекторную функцию (Guy, 1990; Hughes, Dunn, 1996; Thomashow, 1998; Fowler, Thomashow, 2002; Войников и др., 2004). Одним из способов выявления взаимосвязи между активностью транскрипционно-трансляционной системы клеток и ростом устойчивости рас-

тений к холodu является ингибиторный анализ. В частности, с помощью ингибиторов биосинтеза белка была установлена зависимость процесса формирования повышенной устойчивости как холодостойких (Трунова, Зверева, 1977; Дроздов и др., 1984; Титов и др., 2006), так и теплолюбивых (Дроздов и др., 1984; Титов и др., 2006) растений от синтеза белков *de novo* при постоянном действии на них низких закаливающих (субповреждающих) температур. Однако следует иметь ввиду, что адаптивный потенциал растений представлен достаточно широким спектром взаимодополняющих друг друга защитно-приспособительных реакций, которые связаны не только с молекулярно-генетическими, но и с физиологическими и биохимическими механизмами, реализуемыми на посттрансляционном уровне, а также с различными ультраструктурными и ана-

томо-морфологическими изменениями, носящими адаптивный характер.

Учитывая это, в данной работе исследованы некоторые физиолого-биохимические особенности реакции представителей группы теплолюбивых (огурец) и группы холодостойких (пшеница) растений, у которых подавлен биосинтез белков на 80S цитоплазматических рибосомах (с помощью циклогексимида, ЦГ) или на 70S рибосомах митохондрий и хлоропластов (с помощью хлорамфеникола, ХФ), на два разных типа холодовых воздействий – длительное постоянное действие низкой (субповреждающей) температуры (ПНТ) и кратковременные, ежесуточно повторяющиеся понижения температуры (ДРОП-воздействия, от англ. *drop* – падение), с которыми растения часто сталкиваются в естественных условиях и которые в качестве агротехнического приема достаточно широко используются в тепличном производстве компактной рассады овощных и цветочных культур как альтернатива применению ретардантов (Myster, Moe, 1995; Carvalho et al., 2008). Важно, что в ответ на оба указанных типа низкотемпературных воздействий растения способны повышать свою устойчивость (Титов и др., 2006; Марковская и др., 2007). Но если зависимость роста холодоустойчивости растений от транскрипционно-трансляционной системы при постоянном действии на растения низких субповреждающих температур надежно установлена и неоднократно подтверждалась (Hughes, Dunn, 1996; Thomashow, 1999; Титов и др., 2006; Марковская и др., 2007), то вопрос об участии белоксинтезирующей системы в повышении устойчивости растений к кратковременным ежесуточным понижениям температуры (ДРОП-воздействиям) остается пока открытым.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растения огурца (*Cucumis sativus* L., гибрид Зозуля F1) и пшеницы (*Triticum aestivum* L., с. Московская 39) выращивали в камере искусственного климата (Vötsch, Германия) в рулонах фильтровальной бумаги на питательном растворе (рН 6.2–6.4) при температуре воздуха 23°C, фотопериоде 12 ч, освещенности 150 мкмоль/(м² с) ФАР, влажности воздуха 70%.

Опыт 1. С целью выяснения роли белоксинтезирующей системы в процессах адаптации растений и повышения их устойчивости к низкотемпературным воздействиям растения в возрасте 8 сут (от дня замачивания семян) в течение 6 сут подвергали: а) постоянному (круглосуточному) действию температуры 4°C (пшеница – фаза первого листа) и 12°C (огурец – фаза семядольных листьев) (вариант ПНТ) или б) действию этих же температур в течение 2 ч ежесуточно в конце ночного периода (вариант ДРОП). Контрольные растения не подвергались действию холода, остава-

ясь все время при температуре 23°C. За сутки до начала низкотемпературных воздействий часть растений всех вариантов (контроль, ДРОП и ПНТ) переводили на водные растворы циклогексимида (ЦГ, 0.8 мг/л для огурца и 12 мг/л для пшеницы) и хлорамфеникола (ХФ, 200 мг/л для обеих культур). Концентрации ингибиторов, эффективно тормозящие процесс повышения холодоустойчивости растений огурца и пшеницы, были выбраны на основании предыдущих исследований (Титов и др., 1981; Титов, Критенко, 1985). Вторую часть растений вариантов контроль, ДРОП и ПНТ оставляли на воде без ингибиторов. Смену растворов проводили каждые двое суток.

Опыт 2. Для выявления сходства или различий в механизмах повышения холодоустойчивости растений при двух типах низкотемпературного воздействия на растения (ДРОП и ПНТ) использован метод их комбинированного воздействия (наложения). Для этого растения огурца также в возрасте 8 сут в течение одних (вариант 1), трех (вариант 2) или пяти суток (вариант 3) подвергали постоянному воздействию температуры 12°C, а в последующие трое суток – ДРОП-воздействиям (2 ч при 12°C в конце ночного периода) (соответственно, варианты 4, 5 и 6).

В ходе опытов (на 2, 4 и 6-е сутки) определяли площадь листьев у огурца и длину листьев у пшеницы. Суммарное содержание хлорофиллов оценивали с помощью измерителя уровня хлорофилла SPAD 502 Plus (Konica Minolta, Osaka, Япония).

О холодоустойчивости клеток листьев судили по температуре (ЛТ₅₀), вызывающей гибель 50% палисадных клеток листовых высячек после их 5-минутного промораживания в термоэлектрическом термостате ТЖР (“Интерм”, Россия) при последовательном снижении температуры с шагом 0.4°C (Дроздов и др., 1976). Жизнеспособность клеток определяли с помощью светового микроскопа Микмед-2 (ЛОМО, Россия) по коагуляции цитоплазмы и деструкции хлоропластов.

Фотосинтез, устьичную проводимость и транспирацию листьев анализировали с помощью портативной фотосинтетической системы НСМ-1000 (Walz, Германия) при температуре листа 23°C и ФАР, равной 1000 мкмоль/(м² с). Параметры газообмена определяли после полной стабилизации процесса.

Интенсивность дыхания определяли полярографически с использованием электрода Кларка (Oxygraph System Plus, Hansatech, UK). Для этого диски площадью 2.6 см², вырезанные из листьев огурца, и сегменты листьев пшеницы длиной 2 см и шириной не более 2 мм помещали в измерительную кювету с 2 мл буферного раствора 100 мМ НЕПЕС (рН 7.5). Перед каждым измерением буферный раствор насыщали кислородом. Образцы растений выдерживали в буферном растворе в

Таблица 1. Степень ингибирования (%) циклогексимидом (ЦГ) и хлорамфениколом (ХФ) физиологических процессов у огурца и пшеницы в зависимости от типа низкотемпературного воздействия (ДРОП и ПНТ)

Показатель	Контроль		ДРОП		ПНТ	
	ЦГ	ХФ	ЦГ	ХФ	ЦГ	ХФ
Огурец						
Площадь листьев	47	42	35	44	32	19
Видимый фотосинтез	42	86	64	97	36	100
Транспирация	39	49	57	69	35	31
Дыхание	37	33	8	0	0	45
Холодаустойчивость (ЛТ ₅₀)	2 сут 6 сут	0 0	45 39	55 38	50 67	30 33
Пшеница						
Длина 2-го листа	36	47	33	47	17	2
Видимый фотосинтез	54	81	84	88	79	36
Транспирация	20	22	21	36	42	0
Дыхание	0	4	7	10	13	0
Холодаустойчивость (ЛТ ₅₀)	2 сут 6 сут	0 0	42 37	50 37	47 56	37 36

Примечание. Значения приведенных в таблице показателей рассчитаны согласно формуле, приведенной в методике. В вариантах ДРОП и ПНТ контролем выступали растения, не обработанные ингибиторами.

темноте 15 мин и после стабилизации процесса в течение 5 мин измеряли скорость снижения содержания кислорода. Дыхание листьев определяли как скорость поглощения кислорода растительным материалом в буферном растворе и рассчитывали на единицу сухого веса. Сухой вес образцов определяли после их высушивания в термостате до постоянного веса при температуре 105°C.

Для измерения флуоресценции хлорофилла использовали анализатор фотосинтеза с импульсно-модулированным освещением (MINI-PAM, "Walz", Германия). Потенциальный квантовый выход фотохимической активности ФС II (F_v/F_m) определяли после 20-минутной темновой адаптации листьев.

Степень ингибирования (СИ) изученных показателей рассчитывали по формуле

$$СИ(%) = 100 - (Оп/К \times 100),$$

где Оп – значения показателя в опыте, а К – в контроле.

Результаты исследований представлены в виде средних значений по двум независимым опытам (в каждом отдельном опыте использовали от 6 до 9 биологических повторностей в зависимости от измеряемого показателя) и их стандартных ошибок. Различия между средними значениями считали достоверными при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты исследований показали, что рост листьев у огурца и пшеницы в варианте ДРОП не отличался достоверно от роста листьев контрольных растений, тогда как в варианте ПНТ он был сильно заторможен. ЦГ и ХФ ингибировали рост листьев у огурца и пшеницы примерно в одинаковой степени, проявляя свое действие во всех вариантах опыта – в контроле, при ДРОП-воздействиях и ПНТ (рис. 1а, б, табл. 1). Исключение составил вариант ПНТ с применением ХФ у пшеницы, в котором ХФ не оказал дополнительного тормозящего эффекта на рост листьев, значительно замедленный постоянным действием низкой температуры. У пшеницы различия между вариантами опыта были более выражены на втором листе, который в период низкотемпературных воздействий и действия ингибиторов находился в состоянии активного роста, тогда как первый лист завершал свой рост.

Содержание хлорофиллов в листьях огурца и пшеницы в варианте с ДРОП-воздействиями практически не отличалось от контроля, а в варианте ПНТ было снижено. У огурца оба ингибитора (ЦГ и ХФ) в одинаковой степени снижали содержание хлорофилла в вариантах контроль и ДРОП и практически не оказывали дополнительного негативного воздействия в варианте ПНТ (рис. 1в). У пшеницы ХФ приводил к большему снижению содержания хлорофилла, чем ЦГ, в вариантах контроль и ДРОП, а в варианте ПНТ ХФ, в отличие от

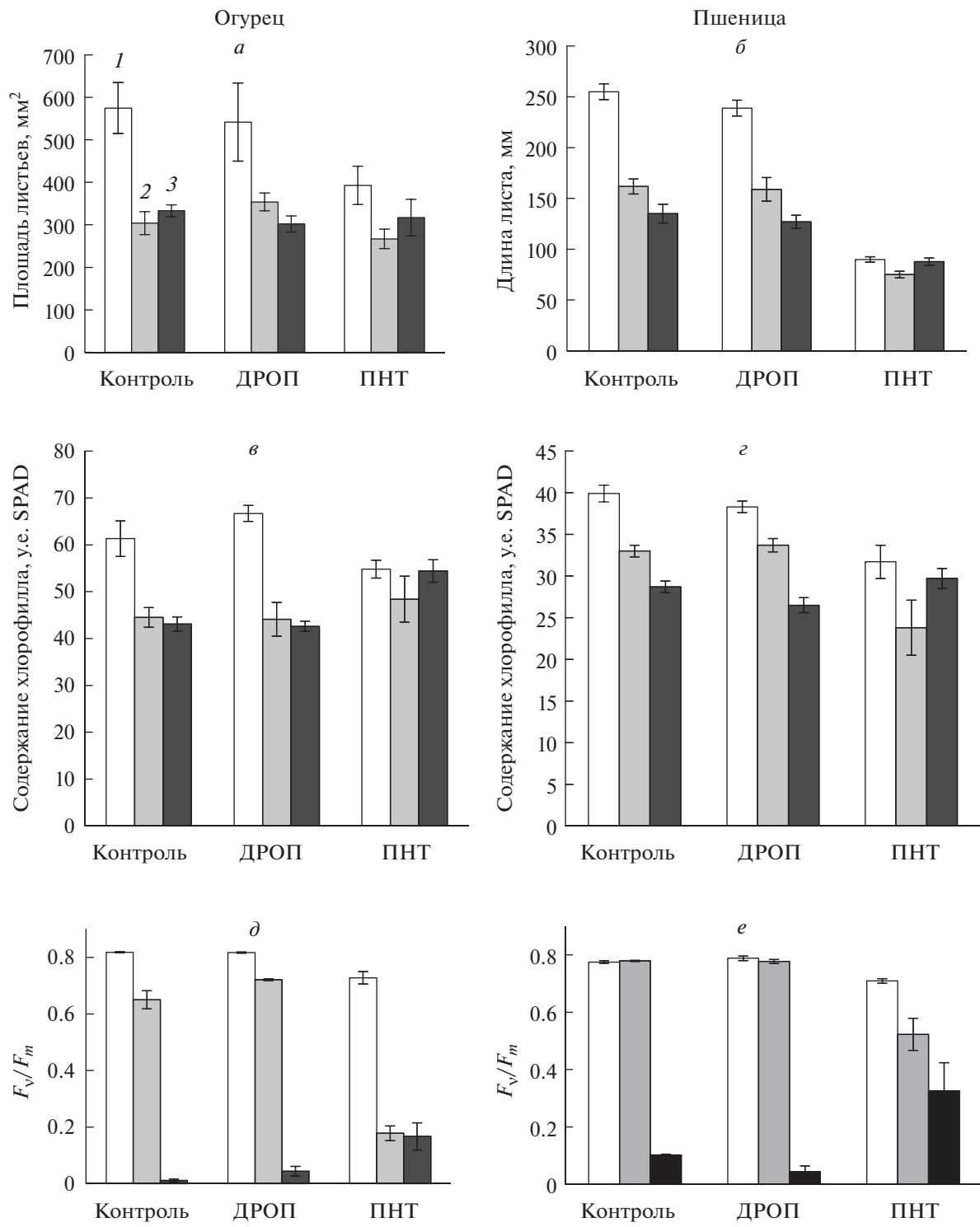


Рис. 1. Влияние ингибиторов синтеза белка на площадь листьев огурца (а) и длину листьев пшеницы (б), содержание хлорофилла в листьях огурца (в) и пшеницы (г), потенциальный квантовый выход фотохимической активности ФФ II (F_v/F_m) листьев огурца (д) и пшеницы (е), не подвергавшихся (Контроль) и подвергавшихся кратковременному (2 ч) ежесуточному (6 сут) понижению температуры в конце ночи до 12°C и 4°C (ДРОП) или продолжительному (6 сут) действию температуры 12°C для огурца и 4°C для пшеницы (ПНТ). 1 – без ингибитора, 2 – с циклогексимидом, 3 – с хлорамфениколом.

ЦГ, не усугублял негативный эффект постоянного действия низкой температуры (рис. 1 σ).

Величина максимального квантового выхода фотохимической активности ФС II (F_v/F_m) в контроле и в варианте с ДРОП-воздействиями была одинаковой (0.82 у огурца и 0.79 у пшеницы), но снижалась до 0.73 у огурца и до 0.71 у пшеницы в варианте ПНТ (рис. 1 d , e), что свидетельствует о нормальном функционировании фотосинтетического аппарата растений (ФСА) в вариантах контроль и ДРОП и о повреждении комплексов ФС II у растений в варианте ПНТ (Bolhár-Nordenkampf et al., 1989; Корнеев, 2002). ЦГ и ХФ оказали неодинаковое влияние на величину F_v/F_m в разных вариантах опыта. У огурца ЦГ приводил к снижению этого показателя до значений 0.65 и 0.72 в вариантах контроль и ДРОП соответственно и к значительно большему его снижению (до 0.18) в варианте ПНТ (рис. 1 d). У пшеницы ЦГ не снижал значений F_v/F_m в варианте с ДРОП-воздействиями по сравнению с контролем, но в варианте ПНТ величина F_v/F_m под влиянием ЦГ была снижена до 0.52 (рис. 1 e). ХФ практически блокировал работу ФС II у огурца и пшеницы во всех вариантах опыта, снизив значения F_v/F_m до 0.01–0.1 в вариантах контроль и ДРОП и проявив меньший, но все же очень сильный эффект в варианте ПНТ (F_v/F_m упало до 0.2–0.3).

Анализ газообмена показал, что у теплолюбивого огурца в варианте ПНТ скорость видимого фотосинтеза, транспирации и устойчивая проводимость снизились на 74, 53 и 60% соответственно, тогда как в варианте с ДРОП-воздействиями эти показатели практически не отличались от контроля (рис. 2 a , b , d). У холодостойкой пшеницы во всех вариантах опыта значимых различий по скорости видимого фотосинтеза, транспирации и устойчивой проводимости не было (рис. 2 b , c , e). Ингибиторы ЦГ и ХФ значительно и примерно до одинаковых величин снижали устойчивую проводимость и скорость транспирации у растений огурца и пшеницы во всех вариантах опыта (рис. 2 a , b , c , e). ХФ практически полностью подавлял видимый фотосинтез у растений огурца (рис. 2 a). ЦГ также снижал скорость фотосинтеза у огурца во всех вариантах опыта, но в меньшей степени, чем ХФ (рис. 2 a). У растений пшеницы ЦГ примерно в одинаковой степени снижал скорость фотосинтеза во всех вариантах опыта, тогда как ХФ оказывал меньший ингибиторный эффект в варианте ПНТ (рис. 2 b).

Скорость дыхания у растений огурца в варианте с ДРОП-воздействиями была ниже контроля и превышала контроль в варианте ПНТ (рис. 2 χ). У пшеницы достоверных различий по скорости дыхания между вариантами опыта без применения ингибиторов не выявлено (рис. 2 χ). ЦГ значительно ингибирировал дыхание у растений огурца в

контроле, но не влиял на этот показатель в вариантах ДРОП и ПНТ. ХФ, напротив, снижал дыхание в контроле и варианте ПНТ и не оказывал влияния на вариант ДРОП (рис. 2 χ). У пшеницы эффекты ингибиторов на скорость дыхания были статистически незначимы (рис. 2 χ).

Как и в предыдущих наших исследованиях (Титов и др., 1981; Дроздов и др., 1984; Титов, 1989; Шерудило, 1990), оба ингибитора не влияли на холодоустойчивость растений при обычной температуре (23°C), поэтому она оставалась неизменной в течение 6 сут опыта (данные не приводятся). В то же время и ЦГ, и ХФ блокировали рост холодоустойчивости листьев при низкотемпературных воздействиях (рис. 3). Однако эффективность действия ингибиторов была разной и зависела от варианта низкотемпературного воздействия. В варианте ПНТ оба ингибитора тормозили рост холодоустойчивости, не оказывая при этом существенного влияния на характер ее повышения (рис. 3). Наиболее ощутимо росту холодоустойчивости препятствовал ЦГ: к концу опыта, через 6 сут постоянного действия температуры 4°C (пшеница) и 12°C (огурец) степень ингибирирования составляла 56 и 67% соответственно (табл. 1). Влияние ХФ на рост устойчивости у огурца и пшеницы было более слабым; степень его ингибирующего действия спустя 6 сут не превышала для обеих культур 33–38% (табл. 1).

При ДРОП-воздействиях также выявлено ингибирующее действие ЦГ и ХФ на рост холодоустойчивости клеток листьев огурца и пшеницы (рис. 3). Как и в варианте ПНТ, динамика повышения устойчивости при ДРОП-воздействиях в присутствии ингибиторов была сходна с динамикой роста холодоустойчивости без ЦГ и ХФ, различаясь только количественно. Однако торможение ингибиторами процесса повышения холодоустойчивости в варианте с ДРОП-воздействиями имело некоторые особенности. В частности, по степени ингибирирования варианты с применением ЦГ и ХФ к концу опыта различались между собой в меньшей степени, чем при ПНТ (табл. 1). Также, в отличие от ПНТ, наибольший ингибирующий эффект в отношении роста холодоустойчивости был отмечен для обоих ингибиторов в начальный период ДРОП-воздействий (через 2 сут), при этом ХФ оказывал более сильное ингибирующее влияние, чем ЦГ (табл. 1). По-видимому, такая особенность в реакции растений на действие ингибиторов белкового синтеза связана с различиями в динамике формирования холодоустойчивости при двух изученных нами типах низкотемпературного воздействия на растения. Если в варианте ПНТ через 2 сут устойчивость возрастила на 80% (пшеница) и 83% (огурец), практически приближаясь к максимальной (рис. 3 b , c), то в варианте с ДРОП-воздействиями в это время прирост холодоустойчивости листьев составлял не

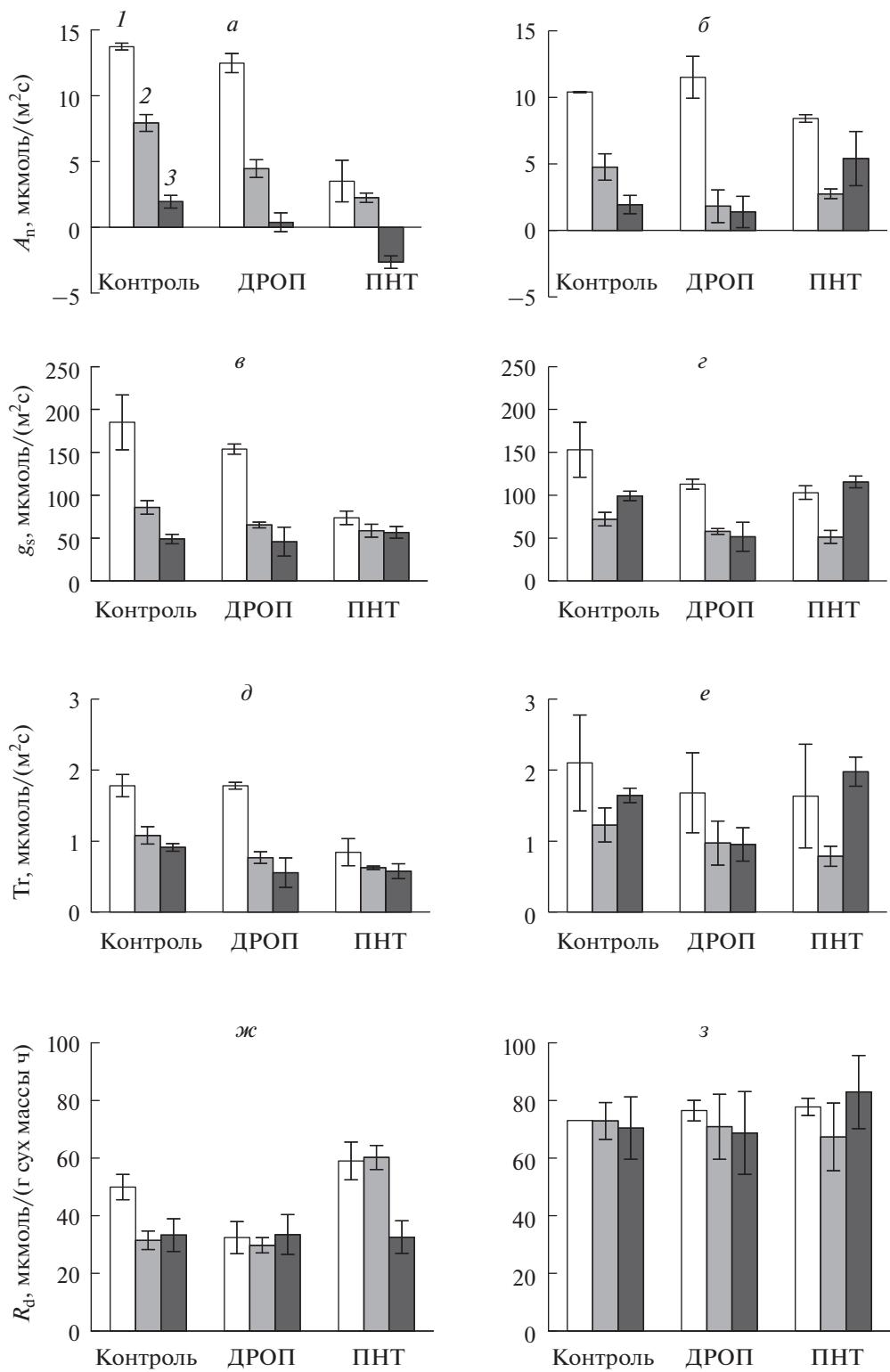


Рис. 2. Скорость видимого фотосинтеза (A_n , *а*, *б*), устьичная проводимость (g_s , *в*, *г*), транспирация (Tr , *д*, *е*), дыхание (R_d , *ж*, *з*) листьев огурца (*а*, *в*, *д*, *ж*) и пшеницы (*б*, *г*, *е*, *з*), не подвергавшихся (Контроль) и подвергавшихся кратковременному (2 ч) ежесуточному (6 сут) понижению температуры в конце ночи до 12°C для огурца и 4°C для пшеницы (ДРОП) или продолжительному (6 сут) действию низкой (12°C и 4°C) температуры (ПНТ). Разные буквы указывают на достоверность различий средних значений при уровне значимости $P < 0.05$. 1 – без ингибитора, 2 – с циклогексимидом, 3 – с хлорамфениколом.

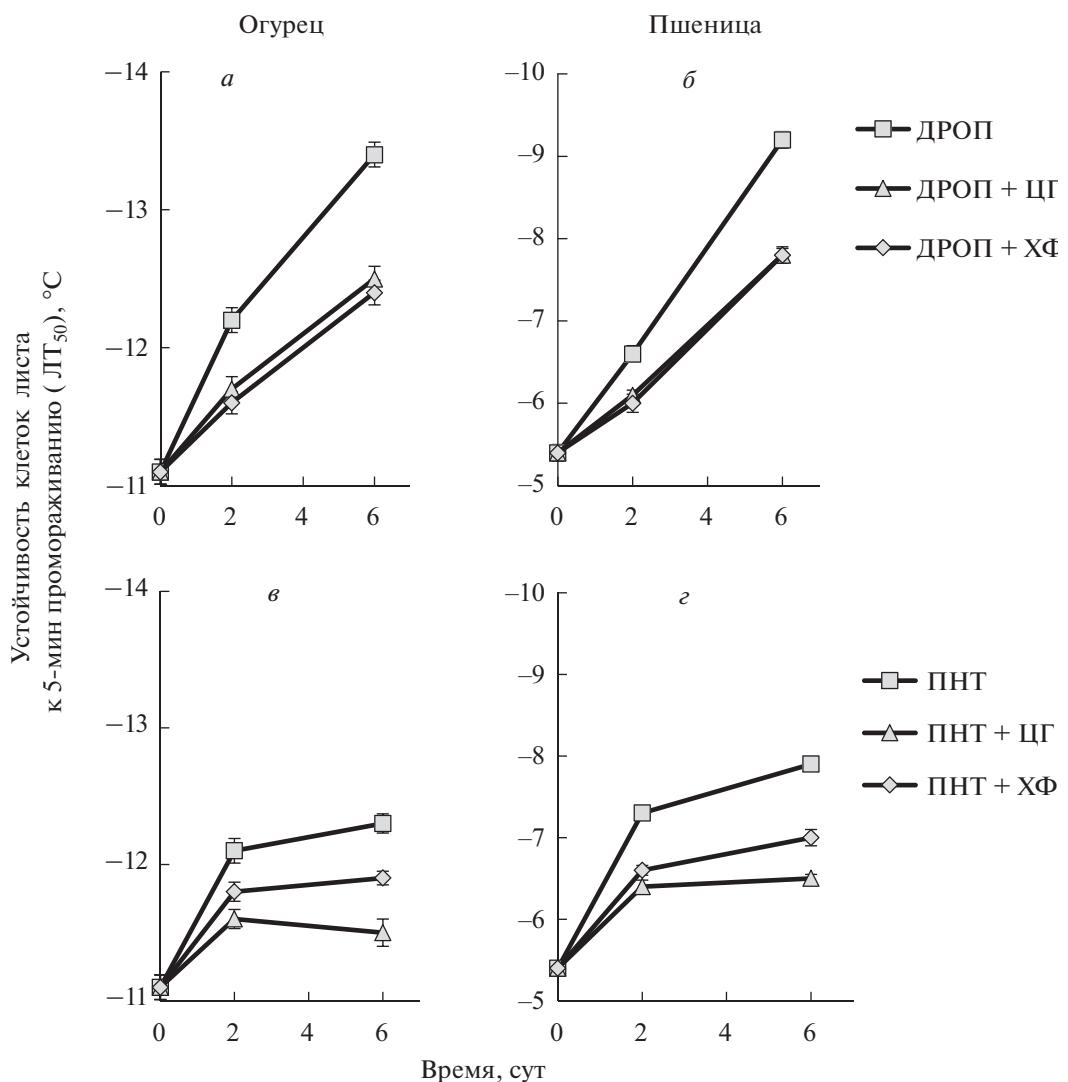


Рис. 3. Влияние ингибиторов синтеза белка на холодаустойчивость (LT_{50}) листьев огурца (а, в) и пшеницы (б, г), подвергавшихся кратковременному (2 ч) ежесуточному (6 сут) понижению температуры в конце ночи до 12 и 4°C (ДРОП) (а, б) или продолжительному (6 сут) действию температуры 12°C для огурца и 4°C для пшеницы (ПНТ) (в, г). ЦГ – с циклогексимидом, XF – с хлорамфениколом.

более 30% у пшеницы и 43% у огурца от максимума (рис. 3а, б).

Отмеченные выше особенности указывают на то, что хотя в реакции растений и на ПНТ, и на ДРОП-воздействия активно участвуют молекулярно-генетические механизмы, и есть в этом плане очевидное сходство, но имеются и определенные различия в механизмах, определяющих ответ растений на эти два типа низкотемпературных воздействий. Для проверки данного предположения нами были проведены опыты с наложением одного вида воздействия (ДРОП-воздействий) на другое (ПНТ), по аналогии с тем как это было сделано ранее в опытах с комбинированным воздействием на растения длительных (несколько суток) и краткосрочных (секунды) тепловых закалок (Титов и др., 1987). Обнаруженное при

этом суммирование их эффектов в отношении теплоустойчивости рассматривалось как подтверждение гипотезы о существовании различий в механизмах ее повышения. В данной работе (опыт 2) растения огурца, постоянно находящиеся в условиях температуры 12°C, ежесуточно подвергали 2-часовым ДРОП-воздействиям (12°C) в течение 3 дней, начиная с первых, третьих или пятых суток от начала постоянного низкотемпературного воздействия (ПНТ). Оказалось, что независимо от уровня хладостойкости, индуцированного ПНТ, ДРОП-воздействия в каждом из этих трех вариантов вызывали дополнительный прирост устойчивости, причем приблизительно одинаковый по своей величине (рис. 4), тем самым подтверждая наше исходное предположение о сущес-

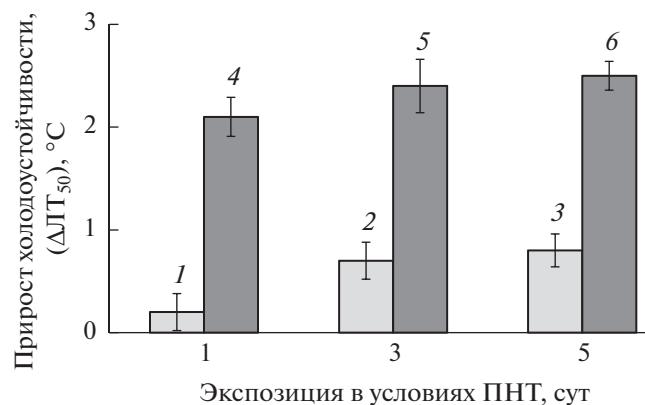


Рис. 4. Прирост холодаустойчивости семядольных листьев огурца при комбинированном (последовательном) действии ПНТ и ДРОП-воздействий. Варианты опыта: 1 – ПНТ 1 сут; 2 – ПНТ 3 сут; 3 – ПНТ 5 сут; 4 – ПНТ 1 сут + ДРОП 3 сут; 5 – ПНТ 3 сут + ДРОП 3 сут; 6 – ПНТ 5 сут + ДРОП 3 сут.

ствовании определенных различий в механизмах реакции растений на ПНТ и ДРОП-воздействия.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенного исследования и их анализ показывают, что оба ингибитора – ЦГ и ХФ – в той или иной степени тормозят рост листьев, независимо от температурного воздействия (контроль, ПНТ или ДРОП), подтверждая зависимость ростовых процессов от синтеза белка (рис. 1).

Снижение скорости темнового дыхания под влиянием ЦГ и ХФ, показанное в нашей работе, согласуется с литературными данными, свидетельствующими о значительном (от 11 до 50%) подавлении дыхания ингибиторами белкового синтеза (Dheidan, Black, 1976; Bieleski, Reid, 1992; Bouma et al., 1994). Отметим, что в литературе отсутствует единое мнение относительно того, действуют ли ингибиторы на дыхание непосредственно, влияя на работу рибосом, или опосредованно – на выработку энергии (Ellis, MacDonald, 1970; Dheidan, Black, 1976). Отсутствие же выраженного влияния ингибиторов на темновое дыхание у пшеницы в нашей работе связано, по-видимому, с возрастной чувствительностью листьев к ингибиторам белкового синтеза, поскольку изменения проводились на первом, закончившем рост листе. Значительно меньшая эффективность ЦГ в плане подавления дыхания у закончивших рост листьев по сравнению с растущими была показана ранее и объясняется более низкой скоростью обретения белка в зрелых листьях (Bouma et al., 1994).

Оба ингибитора во всех вариантах опыта тормозили накопление хлорофилла, но наиболее ощутимо – в контроле и варианте с ДРОП-воздействиями (рис. 1). Отметим, что факт подавления синтеза хлорофиллов под влиянием ЦГ и ХФ

неоднократно отмечался ранее и объясняется ингибированием синтеза ряда ферментов, участвующих в образовании пигментов, а также нарушением структуры хлоропластов (Margulies, 1962; 1964; Keller, Huffaker, 1967; Осипова и др., 1967; Николаева и др., 1970; Zhu et al., 2011).

Торможение синтеза хлорофиллов проходило на фоне значительного уменьшения фотохимической активности ФС II и скорости фотосинтеза в присутствии ЦГ и ХФ (рис. 1, 2). Эти результаты согласуются с литературными данными о большей, по сравнению с синтезом пигментов, чувствительности фотосинтеза к действию ингибиторов белкового синтеза (Margulies, 1964; Осипова и др., 1967; Николаева и др., 1970). Как показали наши исследования, эффективность блокирования работы ФСА варьирует в достаточно широких пределах в зависимости от вида ингибиторов, объекта и варианта опыта. Однако влияние ХФ на показатель F_v/F_m и скорость видимого фотосинтеза заметно превышало аналогичное действие ЦГ во всех вариантах опыта, свидетельствуя о серьезных нарушениях в работе ФСА и о существенной зависимости работы ФС II от синтеза белков на пластидных 70S рибосомах. К возможным причинам снижения фотохимической активности ФС II в присутствии ХФ относят подавление синтеза белка *de novo* в хлоропластах, в частности, синтеза ряда ферментов, участвующих в реакциях световой фазы фотосинтеза (Осипова и др., 1967; Николаева и др., 1970; Chen et al., 1967), а также нарушения структурной организации хлоропластов (Николаева и др., 1970). Кроме того, ХФ может выступать в качестве акцептора электронов ФС II (Rehman et al., 2016), что приводит к повышенному образованию супероксида, вызывающего фотоповреждение ФС II (Nishiama et al., 2001; Rehman et al., 2016). Влияние ЦГ на фотохимическую активность ФС II оказалось слабее, чем ХФ, что указывает на гораздо меньшую зависимость этого показателя от синтеза белка на цитоплазматических 80S рибосомах. Этот вывод подтверждается и известными данными о независимости фотонгибирирования фотосинтеза при низких температурах от синтеза белка на 80S рибосомах, а также его восстановления в оптимальных условиях, в противоположность синтезу белка, происходящему на 70S рибосомах (Gree et al., 1986).

Выявленная в наших опытах меньшая степень ингибирирования роста, синтеза хлорофиллов и процессов газообмена в варианте ПНТ, вероятно, связана не только с торможением синтеза белков при длительном действии низкой температуры, но и с зависимостью эффективности действия ингибиторов от условий роста растений (Осипова и др., 1987; Николаева и др., 1970). При благоприятных для роста растений температурах (контроль в нашем опыте) их ингибирующее действие проявляется в большей степени, чем при неблагоприятных.

приятных температурах (вариант ПНТ в нашем опыте), которые сами по себе отрицательно влияют на рост, содержание пигментов (тормоза их синтез и ускоряя деградацию) и фотосинтетическую активность. С учетом этого близость эффектов ЦГ и ХФ в вариантах контроль и ДРОП можно связать с наличием во втором из них продолжительного (22 ч) периода действия оптимальной температуры (23°C).

Особо отметим, что полученные нами результаты не только подтвердили ранее установленную зависимость процесса повышения холдоустойчивости в условиях постоянного действия низкой температуры (вариант ПНТ) от биосинтеза белка на 70S и особенно на 80S рибосомах (Трунова, Зверева, 1977; Титов и др., 1981; Дроздов и др., 1984; Титов, 1989; Титов и др., 2006, и др.), но и впервые продемонстрировали участие белоксинтезирующей системы в повышении холдоустойчивости растений при кратковременных ежесуточных понижениях температуры (ДРОП-воздействия), т.е. при другом типе низкотемпературного воздействия. Хотя следует подчеркнуть, что участие биосинтеза белка в повышении холдоустойчивости растений при этих двух типах низкотемпературного воздействия имеет и свои особенности. Так, например, эффективность действия ЦГ и ХФ в условиях ПНТ заметно различалась. ХФ при постоянном длительном действии низких температур на растения оказывал ощутимо меньшее, чем ЦГ, ингибирующее действие на рост холдоустойчивости (рис. 3). Меньшая эффективность ХФ в сравнении с ЦГ свидетельствует о большей зависимости формирования повышенной устойчивости растений в варианте ПНТ от активности цитоплазматических 80S рибосом и соответственно от тех белков и ферментов, которые синтезируются в цитоплазме клеток. Эти результаты хорошо согласуются с ранее установленными фактами (Трунова, Зверева, 1977; Титов и др., 1981; Титов, 1989) и не только подтверждают важную роль белоксинтезирующей системы в холдовой адаптации растений, но и разную зависимость этого процесса от синтеза белка на 70S и 80S рибосомах.

Добавим, что при ДРОП-воздействиях оба используемых ингибитора также блокировали рост холдоустойчивости растений (рис. 3). Но в этом случае в начальный период ДРОП-воздействий ХФ отличался от ЦГ большей эффективностью (табл. 1), а к концу опыта их эффективность была примерно одинаковой. Это позволяет считать, что в ответной реакции растений на ДРОП-воздействия 70S рибосомы (и синтезируемые ими белки и ферменты) принимают более активное участие и играют более важную роль, чем при постоянном действии на растения низкой температуры (вариант ПНТ в наших опытах).

Еще одним аргументом в пользу вывода о существовании определенных различий во вкладе

(роли) биосинтеза белка в повышение холдоустойчивости растений при ПНТ и ДРОП-воздействиях служат, по нашему мнению, результаты опыта с комбинированным (последовательным) действием температуры 12°C (ПНТ) и ДРОП-воздействиями на растения огурца (рис. 4). При этом мы исходили из того, что если ПНТ и ДРОП-воздействия активируют одни и те же адаптационные механизмы, то дополнительный прирост устойчивости в случае наложения их эффектов на растения происходит не будет (Шухтина, 1964; Yarwood, 1967; Титов, 1989). Если же они индуцируют включение разных адаптационных механизмов, то эффекты ПНТ и ДРОП-воздействий в отношении устойчивости растений будут полностью или по крайней мере частично суммироваться, как мы отмечали ранее в одной из своих работ, посвященных изучению механизмов теплоустойчивости (Титов и др., 1987). В данном случае опыты с наложением ДРОП-воздействий через одни, трое и пять суток действия ПНТ выявили дополнительное увеличение холдоустойчивости растений, причем практически на одинаковую величину в каждом из этих трех вариантов. Из полученных данных следует, что белки и соответственно кодирующие их гены, активация экспрессии которых происходит под влиянием ПНТ и ДРОП-воздействий, не одни и те же, а хотя бы частично, разные.

Наконец, необходимо отметить и то обстоятельство, что процесс формирования повышенной устойчивости растений при ДРОП-воздействиях наиболее эффективно подавлялся ингибиторами синтеза белка на начальном этапе этого процесса (табл. 1). Подобная закономерность была уже показана ранее в опытах с постоянным действием низкой температуры на растения (Трунова, Зверева, 1977; Титов, 1989; Шерудило, 1990; Титов и др., 2006), и это говорит об особой важности начального этапа процесса холдовой адаптации, когда под влиянием низкой температуры быстро и в достаточных количествах накапливаются белки, необходимые для повышения устойчивости растений. Об этом же свидетельствуют и данные по динамике накопления новых транскриптов в вариантах ПНТ и ДРОП у огурца, которые напрямую коррелировали с динамикой повышения холдоустойчивости только в начальный период (1–2-е сутки) действия низкой температуры (Марковская и др., 2007). Дальнейшее же повышение холдоустойчивости листьев в варианте с ДРОП-воздействиями, в отличие от варианта с ПНТ, происходило уже на фоне снижения транскрипционной активности генетического аппарата. Следовательно, можно заключить, что повышенный уровень холдоустойчивости растений при ДРОП-воздействиях обеспечивается не только благодаря включению молекулярно-генетических механизмов, но и активному участию адаптационных механизмов, которые реализуются на

посттрансляционном уровне. Об этом также говорят полученные нами ранее (Икконен и др., 2012, 2015) и подтвержденные в данной работе данные о способности растений обеспечивать нормальное функционирование ФСА в варианте с ДРОП-воздействиями и показатели газообмена растений в этом же варианте опыта, сопоставимые с контролем.

Таким образом, использование ингибиторного анализа позволило не только установить зависимость ряда важнейших физиологических процессов от биосинтеза белков, но и зависимость процесса повышения холодаустойчивости растений при непродолжительных ежесуточных понижениях температуры (ДРОП-воздействиях) от биосинтеза белков, подобно тому, как это установлено в отношении реакции растений на длительное (постоянное) действие холода (ПНТ). Вместе с тем проведенное исследование выявило и определенные различия, которые существуют в реакции растений на ПНТ и ДРОП-воздействия. Наиболее важное из них заключается в том, что в реакции растений на ПНТ и ДРОП-воздействия участвуют разные механизмы и то, что в реакции на ДРОП-воздействия активную роль играют различные физиолого-биохимические изменения, происходящие на посттрансляционном уровне и носящие адаптивный характер. Последнее, на наш взгляд, объясняется прежде всего тем, что значительно большую часть времени в сутках при ДРОП-воздействиях растения находятся в благоприятных температурных условиях, когда у растений появляется возможность нормализации и восстановления всех тех отклонений и/или нарушений, которые могли появиться в результате охлаждения.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП КарНЦ РАН при финансовой поддержке из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (№ темы 0221-2017-0051).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Войников В.К., Боровский Г.Б., Колесниченко А.В., Рилюанов Е.Г., 2004. Стressовые белки растений. Иркутск: Ин-т географии СО РАН. 129 с.
- Дроздов С.Н., Курец В.К., Титов А.Ф., 1984. Терморезистентность активно вегетирующих растений. Л.: Наука. 168 с.
- Дроздов С.Н., Будыкина Н.П., Курец В.К., Балагурова Н.И., 1976. Определение устойчивости растений к заморозкам // Методы оценки устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды. Л.: Колос. С. 222–228.
- Икконен Е.Н., Шибаева Т.Г., Титов А.Ф., 2015. Реакция фотосинтетического аппарата листа у *Cucumis sativus* L. на кратковременное ежесуточное понижение температуры // Физиология растений. Т. 62. № 4. С. 528–532.
- Икконен Е.Н., Шибаева Т.Г., Сысоева М.И., Шерудило Е.Г., 2012. Устьичная проводимость *Cucumis sativus* L. при длительном и кратковременном действии низких температур // Физиология растений. Т. 59. С. 716–720.
- Корнеев Д.Ю., 2002. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла. К.: Альтерпрес. 188 с.
- Марковская Е.Ф., Сысоева М.И., Шерудило Е.Г., Топчиева Л.В., 2007. Дифференциальная экспрессия генов в растении огурца в ответ на многократные кратковременные низкотемпературные воздействия // Физиология растений. Т. 54. № 5. С. 686–691.
- Николаева М.К., Власова М.П., Осипова О.П., 1970. Изменение пигментного состава и структуры хлоропластов при действии хлорамфеникола // Физиология растений. Т. 17. Вып. 1. С. 5–13.
- Осипова О.П., Николаева М.К., Хайн Х.Я., 1967. К вопросу о действии хлорамфеникола на фотосинтетический аппарат растений // Физиология растений. Т. 14. Вып. 2. С. 210–218.
- Титов А.Ф., 1989. Устойчивость активно вегетирующих растений к низким и высоким температурам: закономерности варьирования и механизмы. Автореферат дис. докт. биол. наук. М.: ИФР РАН. С. 1–42.
- Титов А.Ф., Критенко С.П., 1985. Роль транскрипционно-трансляционной системы в механизмах адаптации пшеницы к холodu и теплу // Биол. науки. № 8. С. 77–81.
- Титов А.Ф., Дроздов С.Н., Критенко С.П., 1981. Влияние специфических ингибиторов транскрипции и трансляции на способность проростков огурца к холодовому и тепловому закаливанию // Физиология растений. Т. 28. № 4. С. 852–859.
- Титов А.Ф., Дроздов С.Н., Таланова В.В., Акимова Т.В., 1987. О механизмах повышения теплоустойчивости растений при краткосрочном и длительном действии высоких температур // Физиология растений. Т. 34. № 1. С. 173–178.
- Титов А.Ф., Акимова Т.В., Таланова В.В., Топчиева Л.В., 2006. Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур // Ин-т биологии КарНЦ РАН. М.: Наука. 143 с.
- Трунова Т.И., Зверева Г.Н., 1977. Влияние ингибиторов белкового синтеза на морозостойкость пшеницы // Физиология растений. Т. 24. № 2. С. 395–402.
- Шерудило Е.Г., 1990. Устойчивость растений ячменя к низким и высоким температурам. Автореферат дис. канд. биол. наук. Казань: Казанский ин-т биологии. 19 с.
- Шухтина Г.Г., 1964. Влияние повторных тепловых закалок на теплоустойчивость растительных клеток // Цитологические основы приспособления растений к факторам среды. М.; Л.: Наука. С. 26–29.
- Bielski R.L., Reid M.S., 1992. Physiological changes accompanying senescence in the ephemeral daylily flower // Plant Physiol. V. 98. P. 1042–1049.
- Bolhàr-Nordenkampf H.R., Long S.P., Baker N.R., Öquist G., Schreiber U., Lechner E.G., 1989. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation // Funct. Ecol. V. 3. P. 497–514.
- Bouma T.J., Visser R., De, Janssen J.H.J.A., Kock M.J., De, Leeuwen P.H., Van, Lambers H., 1994. Respiratory energy requirements and rate of protein turnover *in vivo*

- determined by the use of an inhibitor of protein synthesis and a probe to assess its effect // *Physiol. Plant.* V. 92. P. 585–594.
- Browse J., Xin Z.G.*, 2001. Temperature sensing and cold acclimation // *Curr. Opin. Plant Biol.* V. 4. P. 241–246.
- Carvalho S.M.P., Noort F., van Postma R., Heuvelink E.*, 2008. Possibilities for producing compact floricultural crops. Wageningen: Wageningen UR Greenhouse Horticulture. Report 173. 68 p.
- Chen S., McMahon D., Bogorad L.*, 1967. Early effects of illumination on the activity of some photosynthetic enzymes // *Plant Physiol.* V. 42. № 1. P. 1–5.
- Dheidan M., Black M.*, 1976. The inhibitory action of cycloheximide on respiration of coleoptiles is relieved by light // *Physiol. Plant.* V. 37. № 1. P. 83–88.
- Ellis R.J., MacDonald I.R.*, 1970. Specificity of cycloheximide in higher plant systems // *Plant Physiol.* V. 46. P. 227–232.
- Fowler S., Thomashow M.F.*, 2002. Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway // *Plant Cell.* V. 14. P. 1675–1690.
- Gree D.H., Berry J.A., Bjorkman O.*, 1986. Photoinhibition of photosynthesis in bean leaves: role of light and temperature, and requirement for chloroplast-protein synthesis during recovery // *Planta.* V. 1. P. 253–260.
- Guy C.L.*, 1990. Cold acclimation and freezing stress tolerance: Role of protein metabolism // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* V. 41. P. 187–223.
- Huges M.A., Dunn M.A.*, 1996. The molecular biology of plant acclimation to low temperature // *J. Exp. Bot.* V. 47. P. 291–305.
- Keller C.J., Huffaker R.C.*, 1967. Evidence for in vivo light-induced synthesis of ribulose-1,5-diP carboxylase and phosphoribulokinase in greening barley leaves // *Plant Physiol.* V. 42. № 9. P. 1246–1254.
- Margulies M.M.*, 1962. Effect of chloramphenicol on light-dependent development of seedlings of *Phaseolus vulgaris* var. Black Valentine, with particular reference to development of photosynthetic activity // *Plant Physiol.* V. 37. № 4. P. 473–480.
- Margulies M.M.*, 1964. Effect of chloramphenicol on light-dependent synthesis of proteins and enzymes of leaves and chloroplasts of *Phaseolus vulgaris* // *Plant Physiol.* V. 39. № 4. P. 579–585.
- Myster L., Moe R.*, 1995. Effect of diurnal temperature alternations on plant morphology in some greenhouse crops – a mini review // *Sci. Hort.* V. 62. P. 205–215.
- Nishiyama Y., Yamamoto H., Allakhverdiev S.I., Inaba H., Yokota A., Murata N.*, 2001. Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery // *EMBO J.* V. 20. P. 5587–5594.
- Rehman A.U., Kodru S., Vass I.*, 2016. Chloramphenicol mediates superoxide production in photosystem II and enhances its photodamage in isolated membrane particles // *Front. Plant Sci.* V. 7. P. 479–483.
- Thomashow M.F.*, 1998. Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance // *Plant Physiol.* V. 118. № 1. P. 1–7.
- Thomashow M.F.*, 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms // *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* V. 50. P. 571–599.
- Thomashow M.F.*, 2001. So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! // *Plant Physiol.* V. 125. P. 89–93.
- Yarwood C.E.*, 1967. Adaptation of plants and plant pathogens to heat // *Publ. Amer. Assoc. Adv. Sci.* V. 84. P. 75–92.
- Zhu H., Chen X., Pan X., Zhang D.*, 2011. Effect of chloramphenicol on pigmentation, proline accumulation and chlorophyll fluorescence of maize (*Zea mays*) seedlings // *Int. J. Agric. Biol.* V. 13. P. 677–682.

Comparative Study of Plant Physiological Responses to Prolonged Permanent and Short-Term Daily Exposures to Chilling Temperature in the Presence of Protein Synthesis Inhibitors

E. G. Sherudilo^a, T. G. Shibaeva^{a,*}, E. N. Ikkonen^a, A. F. Titov^a

^a*Institute of Biology, Karelian Research Center, RAS, Russia 185910 Petrozavodsk, Pushkinskaya st., 11*

*e-mail: shibaeva@krc.karelia.ru

The role of the protein synthesis system in physiological responses of chilling-sensitive (cucumber) and chilling-tolerant (wheat) plants to prolonged permanent effect of low temperature (LT treatment, 12°C for cucumber and 4°C for wheat) and short-term daily temperature drop (DROP treatment, for 2 hours at the end of the night to 12°C for cucumber and to 4°C for wheat) was studied using inhibitors of protein synthesis on 80S ribosomes (cycloheximide, CHX) and 70S ribosomes (chloramphenicol, CAP). CHX and CAP inhibited leaf growth of control plants (grown constantly at 23°C) and LT- and DROP-treated plants also. Both inhibitors reduced the rates of net photosynthesis, transpiration, dark respiration, and chlorophyll accumulation in all treatments, but to a larger degree in control and DROP-treated plants. The results confirmed the previously established dependence of enhanced chilling tolerance in LT-treated plants on protein biosynthesis on 70S and, especially, on 80S ribosomes. It was demonstrated for the first time that the protein synthesis system is involved in the improving plant chilling tolerance by short-term daily temperature drops (DROP treatment), which often occur in the regions with temperate climate and are used as a technical tool in greenhouse production to reduce stem elongation as an alternative to chemical growth retardants. Obtained data testify that enhanced chilling tolerance of DROP-treated plants is ensured not only by *de novo* protein synthesis, but also by adaptive posttranslational control.