

ORIGINAL ARTICLE

**The participation of cyanide-resistant respiration in heat generation
and antioxidative defense of cell in winter wheat shoots under cold
influence**

**Grabelnych O.I.¹, T.P. Pobezhimova¹, A.M. Korzun¹, S.A. Voznenko²,
N.A. Koroleva¹, N.S. Pavlovskaya¹, O.A. Borovik¹, V.K. Voinikov¹**

¹ *Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
Lermontova st., 132, Irkutsk, 664033 (Russia);*

² *Irkutsk State University, Suhe-Batora St., 5, Irkutsk, 664003 (Russia)*

*E-mail: grolga@sifibr.irk.ru

Received October 28, 2011

It was shown, that activation of the cyanide-resistant respiration by treatment of 30 mkM antimycine A and 10 mM hydrogen peroxide during 24 hours induced the intensification of heat generation by tissues of winter wheat shoots and decreased death of shoots under subsequent action of freezing temperature -6 °C (3 hours). At the same time the activation of alternative pathway in winter wheat shoots under long-term action of low temperature effectively prevented the reactive oxygen species (ROS) production in electron transport chain (ETC) of mitochondria, which was induced by oxidizing substrate and antimycine A.

Key words: *alternative oxidase / heat generation / reactive oxygen species / low temperature stress / Triticum aestivum L.*

ORIGINAL ARTICLE

Участие цианидрезистентного дыхания в термогенерации и антиокислительной защите клетки в проростках озимой пшеницы при холодовом воздействии**Грабельных О.И.¹, Т.П. Побежимова¹, А.М. Корзун¹, С.А. Возненко²,
Н.А. Королева¹, Н.С. Павловская¹, О.А. Боровик¹, В.К. Войников¹**

¹ Учреждение Российской академии наук Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, 664033 Иркутск, а/я1243, ул. Лермонтова, 132, Россия;

² ФГБОУ ВПО Иркутский государственный университет, 664003 Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5, Россия

*E-mail: grolga@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 28 Октября 2011

В работе показано, что активация цианидрезистентного дыхания 24-х часовой обработкой 30 мкМ антимицином А и 10 мМ перекисью водорода вызывает усиление тепловыделения тканями проростков озимой пшеницы и снижает их гибель при последующем действии отрицательной температуры -6 °С (3 часа). В то же время активация альтернативного пути в проростках озимой пшеницы при длительном действии низкой положительной температуры эффективно предотвращает образование активных форм кислорода (АФК) в ЭТЦ митохондрий, индуцируемое субстратом окисления или антимицином А.

Key words: альтернативная оксидаза / тепловыделение / активные формы кислорода / низкотемпературный стресс / *Triticum aestivum L.*

Функционирование энергорассеивающих систем митохондрий растений (альтернативной оксидазы - АО и разобщающих белков) и изучение их физиологической роли в стрессовых условиях является в последнее время интенсивно изучаемым вопросом, что обусловлено важностью выполняемых этими системами функций (Грабельных, 2005). Хорошо известно, что АО участвует в термогенезе тканей цветка некоторых ароидных и лотосовых. Термогенез

явно выражен у однодольных растений семейства Ароидные (лат. *Araceae*): *Arum italicum*, *Arum maculatum*, *Simplocarpus foetidus*, *Simplocarpus renifolius*, *Sauromatum guttatum*, *Philodendron selloum* (синоним *Philodendron bipinnatifidum*) и двудольных растений семейства Лотосовые (лат. *Nelumbonaceae*): *Nelumbo nucifera* (Zhu et al., 2011). Несмотря на смену внешних температур, выделение тепла организмом на клеточном уровне поддерживает

температуру его тканей, что облегчает испарение соединений, привлекающих насекомых-опылителей (Watling et al., 2008). Так, показано, что при цветении *A. maculatum*, *N. nucifera* и *P. bipinnatifidum* происходит значительная термогенерация, обусловленная активацией АО (Miller et al., 2010; Zhu et al., 2011). Активация как АО, так и UCP-подобных разобщающих белков лежит в основе терморегуляции початка восточной скунсовой капусты *S. renifolius*, когда температура в початке становится на 15 °C выше по сравнению с температурой окружающей среды (Onda et al., 2008). Вопрос о функциональной роли энергорассеивающих систем при низкотемпературном стрессе у нетермогенных растений остается дискуссионным. Мы не исключаем участие альтернативного пути дыхания в термогенерации при низкотемпературном стрессе и предполагаем, что у нетермогенных растений роль термогенеза может заключаться в предотвращении переохлаждения тканей при кратковременных заморозках и, тем самым, в повышении выживаемости растений (Tourchaninova et al., 2005). Слабо выраженная термогенерация у закаленных к холоду проростков озимой пшеницы при холодовом шоке (Kolesnichenko et al., 2003) позволяет предполагать другие функции энергорассеивающих систем в этих условиях, в частности, антиоксидантную. Выдвинутые предположения были нами проверены в экспериментах с использованием этиолированных проростков озимой пшеницы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали проростки озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Иркутская), выращенные в темноте на влажной

фильтровальной бумаге при 26 °C. Обработку антимицином А (в концентрации 30 мкМ) и перекисью водорода (в концентрации 10 мМ) проводили на 2-х дневных проростках, которые опрыскивали соответствующим раствором и затем продолжали выращивать на этом растворе в течение 24 часов. Выживаемость проростков оценивали путем подсчета выживших и возобновивших рост проростков после их промораживания при температуре -6 °C (в течение 3 часов) с последующим переносом на 24 часа в холодильную камеру с температурой 2-3 °C и дальнейшим отрастанием при 26 °C в течение 3 суток. В качестве контроля использовали проростки, выращенные на воде.

Для прохождения закаливания кювету с 2,5 дневными проростками, выращенными при 26 °C, переносили в холодильную камеру с температурой 2-4 °C на 7 суток. Выживаемость проростков оценивали как описано выше, только промораживание проводили при температуре -8 °C (в течение 2-6 часов).

Митохондрии выделяли из побегов проростков при помощи дифференциального центрифугирования с последующей очисткой в ступенчатом градиенте перколла по методике (Побежимова и др., 2001).

Скорость дыхания митохондрий и отрезков побегов определяли полярографически с использованием кислородного электрода Кларка в ячейке объемом 1,4 мл при 26 °C. В качестве субстрата окисления использовали 8 мМ сукцинат в присутствии 5 мМ глутамата. Сукцинатдегидрогеназу активировали, добавляя 200 мкМ АТФ, альтернативную оксидазу – 1 мМ пируват и 5 мМ дитиотреитол. Для ингибирования комплекса I ЭТЦ использовали 3 мкМ ротенон, комплекса III ЭТЦ - 20 мкМ

антимицин А, цитохромоксидазы – 0,4 мМ KCN, альтернативной оксидазы – 1 мМ бензгидроксамовую кислоту (БГК). Содержание свободных жирных кислот устраняли добавлением 0,1% бычьего сывороточного альбумина. Концентрацию митохондриального белка определяли согласно (Lowry et al., 1951). Цитохромный путь дыхания в побегах проростков блокировали 0,8 мМ KCN, альтернативный – 2 мМ БГК. Скорость поглощения кислорода в побегах проростков, оставшуюся после совместного добавления KCN и БГК, не принимали в расчет дыхательной активности.

Содержание АФК в изолированных митохондриях и интактных побегах определяли с использованием $H_2DCF-DA$ (2', 7'-дихлорофлуоресцеиндиацетата), который переходит во флуоресцирующую форму (DCF – дихлорофлуоресцеин) при реакции с пероксидом водорода (Maxwell et al., 1999). Для измерения флуоресценции использовали спектрофлуорофотометр RF-5301PC (SHIMADZU, Япония). Для возбуждения флуоресценции DCF использовали свет с длиной волны 480 нм, испускание регистрировали на длине волны 524 нм.

Температуру тканей побегов регистрировали с помощью тепловизора компьютерного для исследования в реальном масштабе времени ТКВр-ИФП «СВИТ» (ИФП СО РАН). 2-3 г побегов живых (контрольных или обработанных антимицином А и перекисью водорода) и убитых нагреванием проростков помещали в бумажные контейнеры с окошком из тонкой лавсановой пленки, которые помещали в низкотемпературную камеру и проводили снижение температуры с 22 °С до – 12 °С. В

течение 2 часов через каждые 60 сек регистрировали изменение температуры в контейнерах с растительным материалом.

Проводили не менее трех независимых опытов. Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Тепловыделение проростками озимой пшеницы при низкотемпературном стрессе в условиях активации альтернативной оксидазы

У митохондрий термогенных растений в норме дыхание сопряжено с фосфорилированием и чувствительно к антимицину А и цианиду. При цветении в тканях большинства термогенных растений дыхание разобщается от фосфорилирования и становится цианид-резистентным (Miller et al., 2010).

Цианидрезистентный путь дыхания можно активировать обработкой растений цианидом или антимицином А. Naydenov с соавт. (2008) показали, что обработка 30 мкМ антимицином А проростков озимой пшеницы вызывает усиление экспрессии *Waox1a* и увеличивает способность альтернативного пути к транспорту электронов. Мы использовали обработку антимицином А для изучения участия АО в тепловыделении тканями проростков озимой пшеницы при низкотемпературном стрессе. Для этого проростки выращивались в течение 2-х суток в обычных условиях на воде, а затем в течение 24 часов на растворе с антимицином А. Кроме того, в данный эксперимент включали обработку перекисью водорода в такой концентрации,

которая может инициировать мягкий окислительный стресс в проростках озимой пшеницы и также вызывать индукцию АО. В предварительных экспериментах с использованием метода полимеразной цепной реакции в реальном времени с интеркалирующим красителем SYBR Green I

нами выявлено, что 24-х часовая обработка проростков озимой пшеницы 30 мкМ антимицином А и 10 мм перекисью водорода вызывает увеличение экспрессии гена *Waox1a* на фоне снижения экспрессии генов *atp6*, *cox2*, *cob* и *Whucpl1* и *Whucpl2* (не показано).

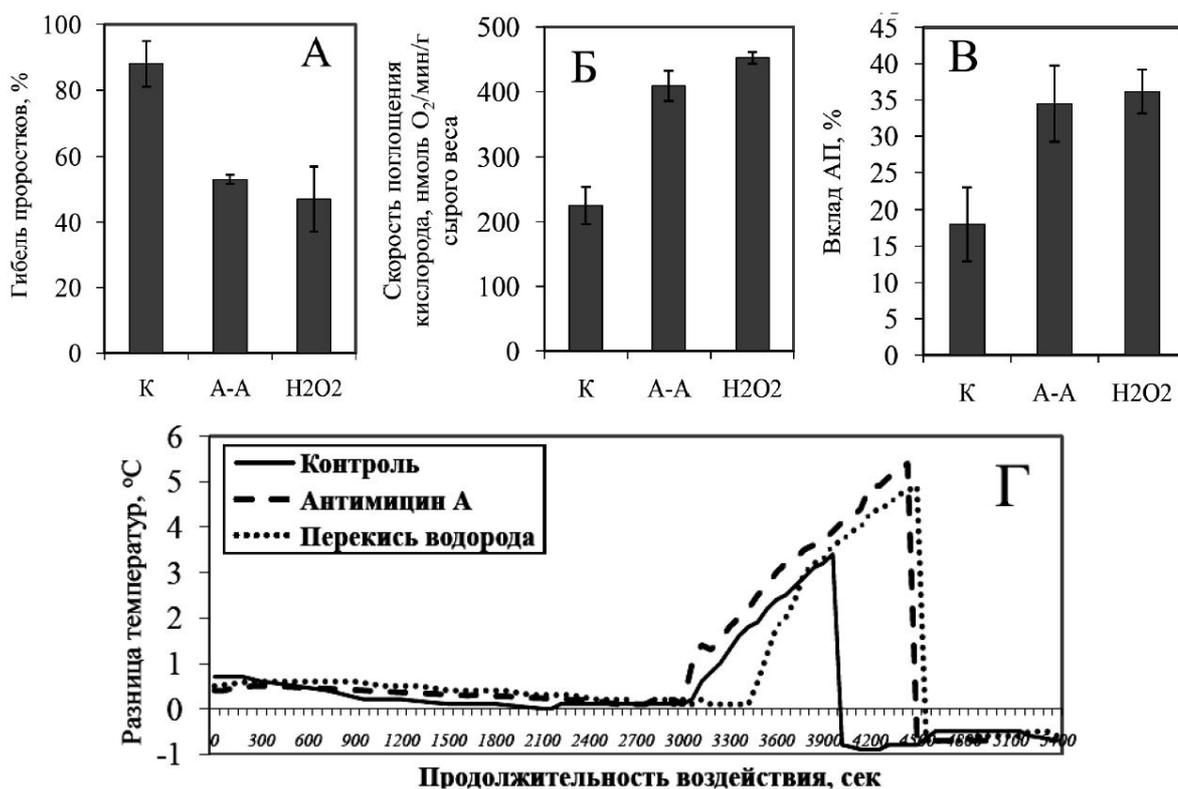


Рисунок 1. Влияние антимицина А и перекиси водорода на выживаемость проростков (А), интенсивность дыхания (Б) и вклад альтернативного пути в дыхание (В) побегов проростков озимой пшеницы и разницу температур между живыми и убитыми проростками озимой пшеницы при снижении температуры в камере с 18 °С до -7 - -11 °С (Г).

А – выживаемость проростков, необработанных (3-х дневные проростки, контроль - К) и обработанных растворами антимицина А (А-А) и перекиси водорода (H₂O₂) (проростки в возрасте 2-х дней обрабатывали А-А и H₂O₂ и продолжали выращивать на этих растворах в течение 24 часов), после действия отрицательной температуры -6 °С (3 часа); Б – интенсивность дыхания отрезков побегов проростков после обработки растворами А-А и H₂O₂; В – вклад альтернативного цианидрезистентного пути в дыхание отрезков побегов проростков после обработки растворами А-А и H₂O₂; Г - разница температур между живыми и убитыми проростками озимой пшеницы, необработанными (Контроль) и обработанными растворами антимицина А и перекиси водорода, при снижении температуры в камере с 18 °С до -7 - -11 °С. Концентрация антимицина А составляла 30 мкМ, перекиси водорода - 10 мМ. n = 3-9, m ± S.D. На рис. 1Г представлены данные характерного опыта.

Как оказалось, обработка антимицином А и перекисью водорода повышала выживаемость проростков озимой пшеницы к повреждающему контролю проростки действию отрицательной температуры $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 часа. Если процент

выживших контрольных проростков после действия данной температуры составил только 12%, то обработка антимицином А увеличивала число выживших проростков до 47%, а перекисью водорода до 53% (рис. 1А).

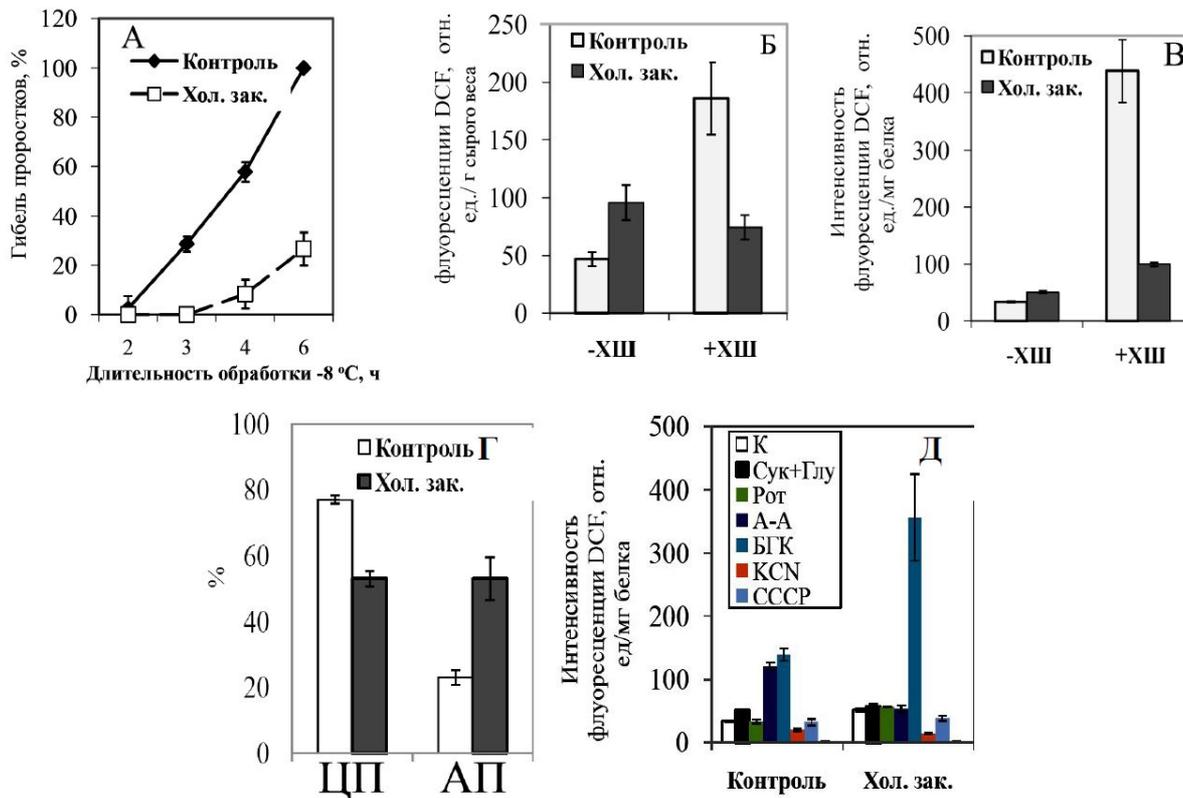


Рисунок 2. Влияние холодового закаливания на параметры жизнедеятельности проростков озимой пшеницы.

А - выживаемость контрольных (выращенных при $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 3 суток) и закаленных (выращенных при $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 2,5 суток и затем подвергнутых обработке температурой $2-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 7 суток) проростков после действия отрицательной температуры $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$; Б - содержание АФК в побегах проростков, подвергнутых и не подвергнутых холодному шоку $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (6 ч) (XIII); В - содержание АФК в митохондриях, изолированных из побегов проростков, подвергнутых и не подвергнутых холодному шоку $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (6 ч) (XIII); Г - вклад цитохромного (ЦП) и альтернативного пути (АП) в дыхание митохондрий контрольных и закаленных проростков; Д - содержание АФК в митохондриях контрольных и закаленных проростков в отсутствии (К) и в присутствии соединений, влияющих на энергетику дыхания. К (контроль) – в отсутствии ингибиторов; Сук+Глу – 8 мМ сукцинат в присутствии 5 мМ глутамата; Рот – 3 мкМ ротенон; А-А – 20 мкМ антимицин А; БГК – 1 мМ БГК; KCN – 0,4 мМ KCN; СССР – 1 мкМ карбонил-цианид-3-хлоро-фенилгидразон. $n = 3-10$, $M \pm m$.

В условиях ингибирования цитохромного пути антимицином А возрастала интенсивность

дыхания побегов проростков озимой пшеницы (в 1,8 раза) (рис. 1Б). Увеличение дыхательной

активности было связано с увеличением вклада альтернативного пути в дыхание (в 1,9 раза) (рис. 1В). Сходные изменения наблюдали и после обработки проростков озимой пшеницы перекисью водорода (рис. 1Б, В). Изучение термогенерации живых и убитых проростков озимой пшеницы выявило, что температура тканей живых проростков при снижении температуры в камере от 17 до -11 °С была на 3 °С выше, чем убитых (в течение первого часа охлаждения) (рис. 1Г). При этом обработка антимицином А и перекисью водорода вызывала увеличение термогенерации тканей проростков, и разница температур между живыми и убитыми проростками этих вариантов достигала 5 °С, при этом увеличивалась длительность термогенерации, по сравнению с контролем (до 25-25 мин). Таким образом, условия, вызывающие активацию альтернативной оксидазы, способствовали большей термогенерации тканей проростков озимой пшеницы при низкотемпературном стрессе и способствовали выживанию проростков.

Роль альтернативной оксидазы при холодовом закаливании проростков озимой пшеницы

Ранее нами было показано, что у закаленных проростков озимой пшеницы при холодовом шоке термогенез выражен слабо (Kolesnichenko et al., 2003). Вероятно, отсутствие необходимости усиления термогенерации становится возможным благодаря комплексу физиолого-биохимических изменений, происходящих во время закаливания озимых злаков и обеспечивающих повышение морозоустойчивости растений (Трунова, 2007). Акклимация растений к холоду в осенний период происходит на фоне постепенного ингибирования ростовых процессов холодом.

При прохождении осеннего закаливания возрастает отношение фотосинтез/дыхание, идёт накопление водорастворимых форм углеводов, что имеет определяющее значение для достижения необходимой морозоустойчивости (Климов, 1998). При подавлении дыхания происходит ингибирование основного цитохромного пути транспорта электронов и активация альтернативного, связанного с функционированием АО. Показано, что действие низких положительных температур приводит к накоплению транскриптов генов АО (Ito et al., 1997; Takumi et al., 2002; Sugie et al., 2006; Mizuno et al., 2008), увеличению содержания белка (Stewart et al., 1990a, 1990b; Gonzalez-Meler et al., 1999) и активации транспорта электронов по альтернативному пути (Elthon et al., 1986; McNulty and Cummins, 1987; Vanlerberghe and McIntosh, 1992; Ribas-Carbo et al., 2000; Grabelnych et al., 2004; Mizuno et al., 2008). Однако вопрос о функциональной роли АО в данных условиях остается дискуссионным. Одной из функций АО является предотвращение образования свободных радикалов за счёт снижения мембранного потенциала при несопряжённом дыхании. В норме содержание АФК в митохондриях поддерживается на низком уровне, благодаря наличию антиоксидантных систем. Однако в стрессовых для клетки условиях содержание АФК начинает увеличиваться, и развивается окислительный стресс. Избегание образования АФК за счёт функционирования АО является первой линией защиты митохондрий от окислительного стресса (Moller and Kristensen, 2004). Введение гена *Waox1a* в *Arabidopsis thaliana* позволило подтвердить гипотезу об антиоксидантной функции АО при низкотемпературном стрессе у растений (Sugie et al., 2006). С использованием

ингибиторов дыхательной цепи нами также показана антиоксидантная функция АО при холодовом закаливании проростков озимой пшеницы.

Нами показано, что длительная обработка низкой положительной температурой (2-4 °С, 7 суток) сопровождается повышением выживаемости этиолированных проростков озимой пшеницы к последующему действию отрицательной температуры (рис. 2А). При этом отрицательная температура не приводит к усилению интенсивности окислительного стресса в побегах предварительно закаленных проростков озимой пшеницы, в то время как у незакаленных проростков содержание АФК при холодовом шоке возрастает в 4 раза (рис. 2Б). Как известно митохондрии являются основным источником образования АФК в нефотосинтезирующих тканях растений (Moller and Kristensen, 2004). Холодовое закаливание проростков озимой пшеницы сопровождалось увеличением содержания АФК в митохондриях, изолированных из побегов этих проростков, в 1,5 раза (рис. 2В). Однако при последующем действии на проростки отрицательной температуры содержание АФК в митохондриях из побегов закаленных проростков увеличивалось всего в 1,96 раза, в то время как в митохондриях из побегов незакаленных проростков в 13 раз (рис. 2В). Можно предполагать, что АФК, генерируемые при холодовом закаливании проростков озимой пшеницы, выполняют сигнальную функцию и запускают экспрессию различных генов, способствующих выживанию в неблагоприятных условиях. В то же время развитие значительного по интенсивности окислительного стресса в митохондриях контрольных проростков сопровождается гибелью проростков при холодовом

шоке. Холодовое закаливание проростков озимой пшеницы приводит к ингибированию вклада цитохромного пути в дыхание митохондрий и усилению вклада альтернативного цианидрезистентного пути (рис. 2Г).

Предположение о возможной антиоксидантной функции АО при холодовом закаливании было нами проверено с помощью ингибиторного анализа. В ходе изучения влияния ингибиторов цитохромного (ротенон, антимицин А, KCN) и альтернативного (БГК) путей транспорта электронов на продукцию АФК митохондриями озимой пшеницы нами выявлены различия в действии ингибиторов на митохондрии, выделенные из контрольных и закаленных проростков. Согласно данным ингибиторного анализа ротенон не вызывал достоверных изменений уровня АФК в контрольных митохондриях, тогда как антимицин А в 3,6 раза усиливал в них продукцию АФК (рис. 2Д). Сходным с антимицином А действием обладал ингибитор альтернативного цианидрезистентного пути – БГК, инкубация митохондрий в присутствии которого вызывала повышение уровня АФК в 4,1 раза (рис. 2Д). В отличие от антимицина А и БГК, KCN – ингибитор цитохромного пути на уровне комплекса IV ЭТЦ подавлял образование АФК митохондриями (на 41%). Разобцитель окислительного фосфорилирования СССР (карбонил-цианид-3-хлоро-фенилгидразон) не влиял на уровень продукции АФК контрольными митохондриями. Полученные результаты согласуются с данными о способности антимицина А и гидроксамовых кислот, как ингибиторов АО, усиливать выработку АФК митохондриями растений (Попов и др., 2003). Как оказалось, в отличие от митохондрий, изолированных из контрольных проростков,

антимицин А не усиливал образование АФК в митохондриях закаленных проростков, а инкубация митохондрий закаленных проростков с БГК в большей мере (в 7 раз) повышала содержание в них АФК (рис. 2Д). В митохондриях из закаленных проростков добавление KCN приводило к более выраженному снижению продукции АФК (на 72%), а также проявлялся антиоксидантный эффект СССР (снижение уровня АФК на 25%). Снижение продукции АФК дыхательной цепью митохондрий в этих условиях при добавлении сукцината и антимицина А и повышение образования АФК при добавлении БГК указывают на антиоксидантную функцию АО и эффективное предотвращение образования АФК дыхательной цепью митохондрий.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о термогенерации тканей проростков озимой пшеницы при низкотемпературном стрессе, при этом вклад в термогенерацию побегов проростков озимой пшеницы может вносить АО. Другая функция АО, антиоксидантная, реализуется в проростках озимой пшеницы при холодном закаливании.

Работа выполнена при поддержке междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН №45 и гранта РФФИ №10-04-00921.

ЛИТЕРАТУРА

- Грабельных, О.И. (2005) Энергетические функции растительных митохондрий в стрессовых условиях. *J. Stress Physiol. Biochem.*, **1**, 37–54.
- Климов, С.В. (1998) Повышенное отношение фотосинтез/дыхание при низких температурах – важное условие холодного закаливания озимой пшеницы. *Физиол. растений*, **45**, 419–424.
- Побежимова, Т.П., Грабельных, О.И., Колесниченко, А.В., Сумина, О.Н., Войников, В.К. (2001) Локализация белков, иммунохимически родственных субъединицам стрессового белка 310 кД, в митохондриях озимой пшеницы. *Физиол. растений*, **48**, 238–244.
- Попов, В.Н., Рууге, Э.К., Старков, А.А. (2003) Влияние ингибиторов электронного транспорта на образование активных форм кислорода при окислении сукцината митохондриями гороха. *Биохимия.*, **68**, 910–916.
- Трунова, Т.И. (2007) Растение и низкотемпературный стресс. М.: Наука, 54 с.
- Elthon, T.E., Stewart, C.R., McCoy, C.A., Bonner, W.D. (1986) Alternative respiratory path capacity in plant mitochondria: effect of growth temperature, the electrochemical gradient, and assay pH. *Plant Physiol.*, **80**, 378–383.
- Gonzalez-Meler, M.A., Ribas-Carbo, M., Giles, L., Siedow, J.N. (1999) The effect of growth and measurement temperature on the activity of the alternative respiratory pathway. *Plant Physiol.*, **120**, 765–772.
- Grabelnych, O.I., Sumina, O.N., Funderat, S.P., Pobezhimova, T.P., Voinikov, V.K., Kolesnichenko, A.V. (2004) The distribution of electron transport between the main cytochrome and alternative pathways in plant mitochondria during short-term cold stress and cold hardening. *J. Therm. Biol.*, **29**, 165–175.

- Ito, Y., Saisho, D., Nakazono, M., Tsutsumi, N., Hirai, A. (1997) Transcript levels of tandem-arranged alternative oxidase genes in rice are increased by low temperature. *Gene*, **203**, 121–129.
- Kolesnichenko, A.V., Grabelnych, O.I., Pobezhimova, T.P., Turchaninova, V.V., Korzun, A.M., Koroleva, N.A., Zykova, V.V., Voinikov V.K. (2003) Difference between the temperature of non-hardened and hardened winter wheat seedling shoots during cold stress. *J. Thermal Biol.*, **28**, 235–244.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
- Maxwell, D.P., Wang, Y., McIntosh, L. (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 8271–8276.
- McNulty, A.K., Cummins, W.R. (1987) The relationship between respiration and temperature in leaves of the arctic plant *Saxifraga cernua*. *Plant, Cell and Environment*, **10**, 319–325.
- Miller, R.E., Grant, N.M., Giles, L., Ribas-Carbo, M., Berry, J.A., Watling, J.R., Robinson, S.A. (2010) In the heat of the night-alternative pathway respiration drives thermogenesis in *Philodendron bipinnatifidum*. *New Phytologist*, **189**, 1013–1026.
- Mizuno, N., Sugie, A., Kobayashi, F., Takumi, S. (2008) Mitochondrial alternative pathway is associated with development of freezing tolerance in common wheat. *Plant Physiol.*, **165**, 462–467.
- Moller, I.M., Kristensen, B.K. (2004) Protein oxidation in plant mitochondria as a stress indicator. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **3**, 730–735.
- Naydenov, N.G., Khanam, S.M., Atanassov, A., Nakamura, G. (2008) Expression profiles of respiratory components associated with mitochondrial biogenesis during germination and seedling growth under normal and restricted conditions in wheat. *Genes Genet. Syst.*, **83**, 31–41.
- Onda, Y., Kato, Y., Abe, Y., Ito, T., Morohashi, M., Ito, Y., Ichikawa, M., Matsukawa, K., Kakizaki, Y., Koiwa, H., Ito, K. (2008) Functional coexpression of the mitochondrial alternative oxidase and uncoupling protein underlies thermoregulation in the thermogenic florets of skunk cabbage. *Plant Physiol.*, **146**, 636–645.
- Ribas-Carbo, M., Aroca, R., Conzalez-Meler, M.A., Irigoyen, J.J., Sanchezdiaz, M. (2000) The electron partitioning between the cytochrome and alternative respiratory pathways during chilling recovery in two cultivars of maize different in chilling sensitivity. *Plant Physiol.*, **122**, 199–204.
- Stewart, C.R., Martin, B.A., Reding, L., Cerwick, S. (1990a) Respiration and alternative oxidase in corn seedlings during germination at different temperatures. *Plant Physiol.*, **92**, 755–760.
- Stewart, C.R., Martin, B.A., Reding, L., Cerwick, S. (1990b) Seedling growth, mitochondrial capacity of corn genotypes differing in cold tolerance. *Plant Physiol.*, **92**, 761–766.

- Sugie, A., Naydenov, N., Mizuno, N., Nakamura, C., Takumi, S. (2006) Overexpression of wheat alternative oxidase gene *Waoxla* alters respiration capacity and response to reactive oxygen species under low temperature in transgenic Arabidopsis. *Genes Genet. Syst.*, **81**, 349–354.
- Takumi, S., Tomioka, M., Eto, K., Naydenov, N., Nakamura, C. (2002) Characterization of two non-homoeologous nuclear genes encoding mitochondrial alternative oxidase in common wheat. *Gen. Genet. Syst.*, **77**, 81–88.
- Tourchaninova, V.V., Grabelnych, O.I., Pobezhimova, T.P., Korzun, A.M., Voinikov, V.K., Kolesnichenko, V.V., Kolesnichenko, A.V. (2005) The importance of oxidative phosphorylation uncoupling systems function for surviving of winter wheat seedling shoots during short-term cold stress. *J. Stress Physiol. Biochem.*, **1**, 21–29.
- Vanlerberghe, G.C., McIntosh, L. (1992) Lower grows temperature increases alternative pathway capacity and alternative oxidase protein in tobacco. *Plant Physiol.*, **100**, 115–119.
- Watling, J.R., Grant, N.M., Miller, R.E., Robinson, S.A. (2008) Mechanisms of thermoregulation in plants. *Plant Signaling & Behavior*, **3**, 595–597.
- Zhu, Y., Lu, J., Wang, J., Chen, F., Leng, F., Li, H. (2011) Regulation of thermogenesis in plants: the interaction of alternative oxidase and plant uncoupling mitochondrial proteins. *J. Integrative Plant Biology*, **53**, 7–13.