

ORIGINAL ARTICLE

Cold Hardening Prevents H₂O₂-induced Programmed Cell Death in Maize Coleoptiles

A.V. Korsukova^{1,2}, O.I. Grabelnych^{1,2*}, T.P. Pobezhimova¹,
N.A. Koroleva¹, I.V. Fedoseeva¹, N.S. Pavlovskaya^{1,2}, I.V. Lyubushkina^{1,2},
O.A. Borovik¹, A.V. Fedyaeva¹, S.A. Voznenko², E.M. Ilyushneva²,
V.K. Voinikov¹

¹ *Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of RAS, Irkutsk, Russia*

² *Irkutsk State University, Irkutsk, Russia*

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

Received October 25, 2012

An influence of cold hardening (8 °C, 7 days) on the respiration intensity, the content of reactive oxygen species and DNA fragmentation in coleoptiles of maize etiolated seedlings of different ages and a possibility of the cold hardening to prevent execution of the cell death, induced by treatment with 10 mM H₂O₂ (for 4 hours) of seedlings have been studied. It has been shown that H₂O₂ induces total DNA fragmentation in coleoptiles of maize etiolated seedlings, and a preliminary cold hardening prevents this process.

Key words: reactive oxygen species; DNA fragmentation; programmed cell death; coleoptile; Zea mays L.

ORIGINAL ARTICLE

Холодовое закаливание предотвращает индуцированную перекисью водорода программируемую клеточную гибель в колеоптилях кукурузы

А.В. Корсукова^{1,2}, О.И. Грабельных^{1,2*}, Т.П. Побежимова¹,
Н.А. Королева¹, И.В. Федосеева¹, Н.С. Павловская^{1,2},
И.В. Любушкина^{1,2}, О.А. Боровик¹, А.В. Федяева¹, С.А. Возненко²,
Э.М. Ильюшнева², В.К. Войников¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского Отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

² ФГБОУ ВПО Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

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

Поступила в редакцию 25 октября 2012 г.

Изучено влияние холодового закаливания (8 °С, 7 суток) на интенсивность дыхания, содержание активных форм кислорода и фрагментацию ДНК в колеоптилях этиолированных проростков кукурузы разного возраста и возможность холодового закаливания предотвращать развитие клеточной гибели, вызванное обработкой проростков 10 мМ перекисью водорода (в течение 4 ч). Показано, что перекись водорода вызывает фрагментацию тотальной ДНК в колеоптилях этиолированных проростков кукурузы, а предварительное холодовое закаливание предотвращает этот процесс.

Key words: активные формы кислорода; фрагментация ДНК; программируемая клеточная гибель; колеоптиль; *Zea mays* L.

Закаливание растений приводит к усилению их устойчивости по отношению к стрессовым факторам. В период низкотемпературной адаптации происходят различные физиолого-биохимические изменения, способствующие повышению устойчивости растений к действию низкой температуры (Трунова, 2007), а также,

благодаря явлению кросс-толерантности, и к другим стрессовым факторам (Медведев, 2012).

Экзогенная перекись водорода может индуцировать развитие программируемой клеточной гибели (ПКГ) в культурах клеток и интактных растениях. ПКГ у растений является важной составляющей процесса развития,

механизма защиты от патогенов и реакции на действие различных стрессовых факторов. ПКГ у растений имеет черты сходства с апоптозом у животных, такие как межнуклеосомная фрагментация ДНК, конденсация хроматина и активация каспазо-подобных молекул. Важным фактором в развитии ПКГ у растений являются активные формы кислорода (АФК) (Jabs, 1998). Снижение способности клеток удалять или обезвреживать АФК может запускать ПКГ (Jabs, 1998). Окислительный стресс, вызываемый обработкой перекисью водорода, служил причиной ПКГ в культуре клеток сои (Amor *et al.*, 2000), табака (Houot *et al.*, 2001), арабидопсиса (Tiwari *et al.*, 2002). Также пероксид водорода ускорял апоптоз в клетках колеоптилей озимой пшеницы (Ванюшин, 2001; Замятнина *и др.*, 2002) и $CN^{(-)}$ -вызванный апоптоз в замыкающих клетках устьиц из листьев гороха (Самуилов *и др.*, 2006). Окислительный стресс может вызывать нарушения в структуре митохондриальных мембран и функциях митохондриальных белков и приводить к открытию высокопроницаемой митохондриальной поры, которая деполяризует митохондрии и приводит к набуханию и последующему высвобождению цитохрома *c* из межмембранного пространства (Grabelnych, 2005).

Колеоптиль проростков злаков является ювенильным органом и характеризуется краткостью периода развития и завершением физиологической функции по типу ПКГ. В колеоптиле этилированных проростков пшеницы апоптоз происходит на 6-8 день (Кирнос *и др.*, 1999; Бакеева *и др.*, 2001; Ванюшин, 2001; Vanyushin *et al.*, 2004), но изменение уровня АФК под действием анти- и

прооксидантов может сдвигать сроки наступления и интенсивность апоптоза (Замятнина *и др.*, 2002). Может ли холодовое закаливание предотвращать развитие ПКГ в колеоптилях злаков, индуцированное стрессовыми факторами, неизвестно. На культуре клеток арабидопсиса показано, что предварительная мягкая тепловая обработка может предотвращать развитие ПКГ, вызванное жестким тепловым шоком (Rikhvanov *et al.*, 2007).

Целью данной работы явилось изучение возможности холодового закаливания предотвращать развитие гибели клеток колеоптиля этилированных проростков кукурузы, вызванное обработкой проростков перекисью водорода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили этилированные проростки кукурузы (*Zea mays* L., гибрид Российский 199 МВ), выращенные на влажной фильтровальной бумаге при 26°C в темноте в течение 4-7 суток. Холодовому закаливанию подвергали 4-х суточные проростки, помещая их в камеру с температурой 8 °C на 7 суток (общий возраст проростков составил 11 суток). После закаливания проростки оставляли в темноте при температуре 26 °C, отбирая материал сразу, через 1, 2 и 3 суток после воздействия.

Обработку перекисью водорода проводили на 4-х суточных (контроль) или 11-ти суточных (холодовое закаливание) проростках. Для этого проростки погружали корнями в раствор 10 мМ перекиси водорода и выдерживали при температуре 26 °C в течение 4 ч. По истечении времени обработки проростки тщательно

отмывали от перекиси водорода и оставляли в темноте при температуре 26 °С, отбирая материал сразу и через 3 суток после воздействия. Степень ингибирования роста (I, %) (Иванов, 1974) определяли по разнице в длине побегов до воздействия и через 3-е суток после воздействия перекиси водорода.

Об интенсивности дыхания судили по скорости поглощения кислорода отрезками колеоптилей. Скорость поглощения кислорода регистрировали полярографически с платиновым электродом закрытого типа (электрод Кларка) в ячейке объёмом 1,4 мл на полярографе ОН-105 (Венгрия) при температуре 26 °С. Реакционная среда содержала 50 мМ КН₂Р₀₄ (рН 5,2) и 50 мМ сахарозу. В полярографическую ячейку с растительной тканью последовательно добавляли 0,8 мМ цианид калия (KCN, ингибитор цитохромного пути транспорта электронов) и 2 мМ бензгидроксамовую кислоту (БГК, ингибитор альтернативной цианид-резистентной оксидазы). Поглощение кислорода, оставшееся после добавления KCN и БГК, считали неспецифическим и не принимали в расчёт дыхательной активности. Интенсивность дыхания выражали в нмолях поглощённого кислорода в мин на г сырого веса.

Общее содержание АФК в колеоптилях определяли с использованием 2',7'-дихлорофлуоресцеин диацетата (H₂DCF-DA) (Maxwell *et al.*, 1999). Это неполярное соединение, когда проходит внутрь клетки с помощью эстераз превращается в полярное производное H₂DCF, которое само по себе не является флуоресцентным, но быстро окисляется в высоко флуоресцентный дихлорофлуоресцеин (DCF) при реакции с внутриклеточным

пероксидом водорода и другими пероксидами. Для определения АФК навеску ткани (0,1 г) инфильтровали в шприце раствором 1 мкМ H₂DCF-DA и инкубировали 30 мин при 26 °С в темноте. Супернатант использовали для измерения флуоресценции. Флуоресценцию DCF измеряли на спектрофлуорофотометре RF-5301PC (SHIMADZU, Япония). Для возбуждения флуоресценции DCF использовали свет с длиной волны 480 нм, испускание регистрировали на длине волны 524 нм. Содержание АФК рассчитывали в относительных единицах на г сырого веса.

Для выделения общего клеточного белка колеоптили этиолированных проростков замораживали в жидком азоте и растирали в буфере, содержащем 100 мМ Трис-НСl (рН 7,4-7,6), 3 мМ ДДС-На, 1 мМ β-меркаптоэтанола, 0,5-1 мМ фенилметилсульфонилфлюорида, в соотношении 1:4. После центрифугирования при 20000 г в течение 20 мин белок из супернатанта осаждали двукратным объемом охлажденного до -20 °С ацетона. Осадок общего клеточного белка растворяли в буфере для образца (0,125 М Трис-НСl (рН 6,8), 10% ДДС-На, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 1 мМ ЭДТА, 20% глицерин, 0,001% бромфеноловый синий) с последующим нагреванием при 97 °С в течение 5 мин и центрифугированием при 10000 г в течение 15 мин. Белки наносили на гель, предварительно выровняв концентрации по методу Lowry (Lowry *et al.*, 1951), не более 30 мкг на трек. Белки фракционировали электрофоретически в 12,5%-ном ПААГе с ДДС-На в модифицированной системе Laemmli (Laemmli, 1970), используя Mini-PROTEAN 3 Electrophoretic Cell (BIO-RAD, США). Перенос анализируемых белков на нитроцеллюлозную мембрану (Sigma, США)

проводили в Towbin-буфере (25 мМ Трис-НСI (рН 9,2), 192 мМ глицин, 10 % метанол) в соответствии с рекомендациями фирмы производителя, используя Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, США). В работе использовали антитела против дегидринов (Stressgen, США).

Выделение ДНК проводили по модифицированной нами методике (Balk and Leaver, 2001). Растительный материал (0,06-0,08 г) растирали в жидком азоте и лизировали на холоду в 0,4 мл буфера, содержащего 100 мМ Трис-НСI (рН 8,0), 50 мМ ЭДТА, 500 мМ NaCl и 10 мМ β -меркаптоэтанола, с последующим добавлением 25 мкл 20% ДДС-Na. После инкубации в течение 10 мин при 65 °С к образцам добавляли 200 мкл 5 М ацетата К, перемешивали и инкубировали на льду 20 мин. Белки осаждали центрифугированием при 11500 g в течение 20 мин. Супернатант (500-600 мкл) вливали в пробирки с охлажденным изопропанолом (600 мкл) и инкубировали при комнатной температуре 3-5 мин. Нуклеиновые кислоты осаждали центрифугированием при 11500 g в течение 15 мин, дважды промывали 70% этанолом, высушивали, перерастворяли в бидистиллированной воде (100 мкл) и затем добавляли 1/10 объема буфера TE (10 мМ Трис-НСI (рН 7,5) и 1 мМ ЭДТА). Затем инкубировали с РНКазой А (Fermentas, Латвия) 2 ч при 37 °С. Очистку ДНК проводили экстракцией хлороформом с реэкстракцией. К водной фазе добавляли 1/10 объема ацетата К (рН 4,8), осаждали тремя объемами 96%-ного этанола. После центрифугирования (15 мин, 11500 g) полученный осадок высушивали и перерастворяли в буфере TE. Одинаковые количества ДНК разделяли электрофоретически

в 1,5%-ном агарозном геле. Гель окрашивали бромистым этидием (0,5 мг/л) и фотографировали в УФ-свете с помощью GelDoc (Bio-Rad, США).

Проводили не менее трех независимых экспериментов. Представлены средние арифметические значения и их стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С использованием в качестве маркеров апоптоза фрагментации ДНК и изменений на уровне ультраструктурной организации клеток показано, что в колеоптиле этиолированных проростков пшеницы апоптоз происходит на 6-8 день (Кирнос *и др.*, 1999; Бакеева *и др.*, 2001; Ванюшин, 2001; Vanyushin *et al.*, 2004). При этом отличительными ультраструктурными признаками апоптоза на ранней стадии развития колеоптиля 5-6-дневных проростков являются: вакуолизация цитоплазмы; специфическая фрагментация цитоплазмы и появление в вакуоли уникальных одномембранных везикул, содержащих активные органеллы; прекращение синтеза ядерной ДНК; конденсация и маргинация хроматина в ядре; межнуклеосомная фрагментация яДНК и интенсивный синтез митохондриальной ДНК в вакуолярных везикулах (Vanyushin *et al.*, 2004). В колеоптилях кукурузы сроки наступления ПКГ не показаны, однако известно, что все клетки колеоптиля кукурузы переходят от деления к росту растяжением на 3-и сутки развития проростка (Рудашевская *и др.*, 2009). У 3-х суточных проростков наблюдается интенсивная работа H^+ -АТФазы плазмалеммы, а на 4-е сутки развития проростков кластеры H^+ -АТФазы распадаются, и фермент равномерно

распределяется по плазмалемме (Рудашевская и др., 2009). К 5-м суткам, когда лист выходит наружу из-под защиты колеоптиля, происходит значительное снижение роста клеток колеоптиля, гидролитическая активность H^+ -АТФазы сохраняется, что, возможно, позволяет поддерживать основные свойства клетки, характеризующиеся переходом к ПКГ при завершении физиологической функции колеоптиля (Рудашевская и др., 2009). Можно предположить, что на 6-7 сутки роста проростков кукурузы в колеоптиле уже будут наблюдаться признаки ПКГ. Какое влияние на развитие процесса клеточной гибели в колеоптиле злаков оказывает предварительная обработка низкой положительной температурой (холодовое закаливание) не изучено, хотя такие данные могут внести существенный вклад в понимание механизмов регуляции клеточной гибели растений. Поскольку изменение уровня АФК может сдвигать сроки наступления и интенсивность апоптоза (Замятнина и др., 2002), важным представляется выяснение вопроса о влиянии экзогенной перекиси водорода на развитие процесса клеточной гибели в колеоптиле закаленных и незакаленных проростков злаков.

В связи с этим нами было изучено изменение ростовой реакции проростков, изменение интенсивности дыхания и содержания АФК, а также фрагментация ДНК клеток колеоптилей как контрольных (на 4-7 сутки роста), так и закалённых к холоду этиолированных проростков кукурузы в естественных условиях старения и в условиях окислительного стресса, индуцированного обработкой перекисью водорода. В качестве фактора, способствующего закаливанию проростков кукурузы,

использовалась обработка низкой положительной температурой $8^\circ C$ в течение 7-и суток. Данная обработка приводила к синтезу стрессовых белков дегидринов как в колеоптилях, так и в первом листе этиолированных проростков (рис. 1), что свидетельствует об эффективности холодового закаливания проростков кукурузы. Наибольшее содержание наблюдали для дегидринов с молекулярными массами 66 и 50 кДа (рис. 1).

При изучении влияния обработки 10 мМ перекисью водорода в течение 4 ч на длину побегов контрольных и закалённых этиолированных проростков кукурузы обнаружено, что воздействие перекиси водорода вызывает ингибирование длины побегов контрольных проростков на 25%, а предварительное закаливание снижает ингибирующее действие перекиси водорода, которое составляет 14% (рис. 2).

Показано снижение интенсивности дыхания колеоптилей этиолированных проростков кукурузы по мере увеличения возраста проростков. Наиболее интенсивное снижение дыхания наблюдали в колеоптилях на 6-е сутки роста проростков, которое составило 68% по сравнению с дыханием 4-х суточных колеоптилей (рис. 3). На 7-е сутки интенсивность дыхания колеоптилей этиолированных проростков оставалась на уровне дыхания колеоптилей 6-и суточных проростков. Холодовая обработка этиолированных проростков кукурузы низкой положительной температурой сопровождалась снижением интенсивности дыхания колеоптилей, которое составило 40% (рис. 4). В течение последующих 2-х суток после помещения проростков в нормальную температуру роста (возраст

проростков 12-13 суток) интенсивность дыхания колеоптилей характеризовалась увеличением (на 45%) в 1-е сутки отрастания после холодового воздействия, а на 2-е сутки возвращалась к исходному уровню и в дальнейшем незначительно снижалась (рис. 4). Следует отметить, что интенсивность дыхания колеоптилей закалённых проростков через 3-е сутки отрастания при нормальной температуре (26 °C) была выше по сравнению с дыханием колеоптилей контрольных проростков.

Интенсивность дыхания в клетках колеоптилей этиолированных проростков кукурузы коррелировала с содержанием АФК (рис. 3, 4). По мере падения интенсивности дыхания в колеоптилях контрольных проростков кукурузы с возрастом происходило увеличение содержания АФК, которое составило 16% (на 5-е сутки), 46% (на 6-е сутки) и 127% (на 7-е сутки) (рис. 3). Холодовое закаливание сопровождалось увеличением уровня АФК в колеоптилях на 40% по сравнению с колеоптилями контрольных проростков кукурузы (рис. 4). После перемещения проростков, прошедших холодное закаливание, в оптимальную температуру роста (26 °C) увеличение АФК продолжало возрастать на протяжении первых 2-х суток, а затем снижалось. Увеличение уровня АФК в клетках колеоптилей закалённых проростков кукурузы по сравнению с 4-х суточными контрольными проростками составило 66% в 1-е сутки отрастания (или 12-е сутки роста) и 144% на 2-е сутки отрастания (или 13-е сутки роста). На 3-е сутки отрастания проростков (или 14-е сутки роста) наблюдали снижение содержания АФК на

50% по сравнению с содержанием АФК на 2-е сутки отрастания. Известно, что АФК в клетке выполняют двойную функцию: в высоких концентрациях являются повреждающими молекулами и могут вызывать развитие ПКГ, в низких – сигнальными молекулами, при участии которых возникают ответные реакции на стресс, реализуются программы роста и развития растений (Jabs, 1998). Увеличение образования АФК при холодном закаливании может рассматриваться как реализация сигнальной функции данных молекул, что запускает ответную реакцию растений на стресс и позволяет сформировать защитные механизмы, в том числе активацию антиоксидантных систем.

На рис. 5 показано различие в содержании АФК в клетках колеоптилей контрольных и закалённых к холоду этиолированных проростков кукурузы сразу после обработки перекисью водорода. Как следует из данных, увеличения содержания АФК у холодозакалённых проростков сразу после обработки перекисью водорода не происходит, что можно объяснить более эффективной работой антиоксидантных систем у этих проростков. В то же время увеличение содержания АФК в колеоптилях незакалённых проростков, вызванное экзогенной перекисью водорода, может запускать развитие ПКГ. Увеличение содержания АФК в клетке считается одним из первых сигналов, активирующих ПКГ как у растений, так и у животных (Tiwari et al., 2002; Vacca et al., 2004; Gao et al., 2008; Wu et al., 2011).

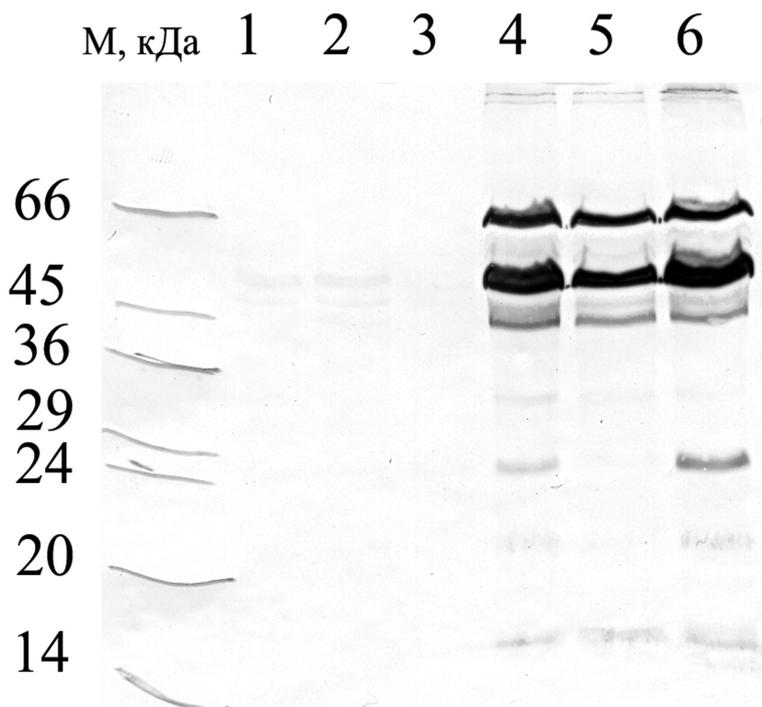


Рис. 1. Накопление дегидринов при холодном закаливании (8 °С, 7 суток) этиолированных проростков кукурузы.

Обозначения: М – маркеры молекулярного веса, кДа; ОКБ - общий клеточный белок; 1 – ОКБ побегов контрольных проростков (колеоптиль + лист); 2 – ОКБ колеоптилей контрольных проростков; 3 – ОКБ первого листа контрольных проростков; 4 – ОКБ побегов закалённых холодом проростков (колеоптиль + лист); 5 – ОКБ колеоптилей закалённых холодом проростков; 6 – ОКБ первого листа закалённых холодом проростков.

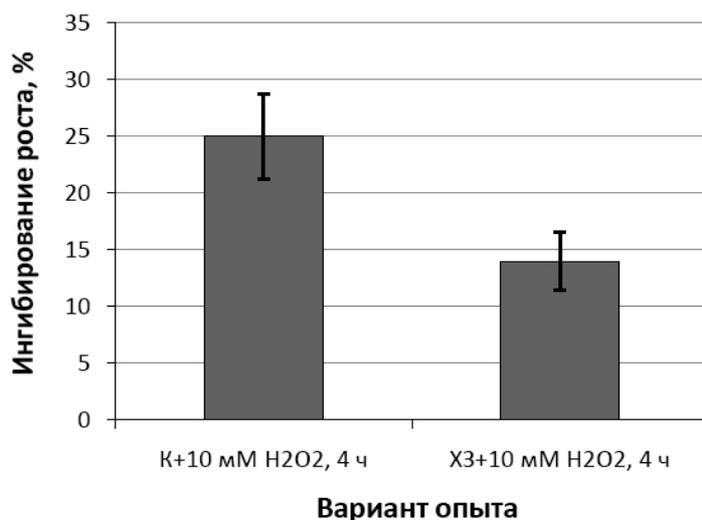


Рис. 2. Влияние перекиси водорода (10 mM H_2O_2 , 4 ч) на ингибирование роста контрольных (К) и холодозакалённых (ХЗ) этиолированных проростков кукурузы.

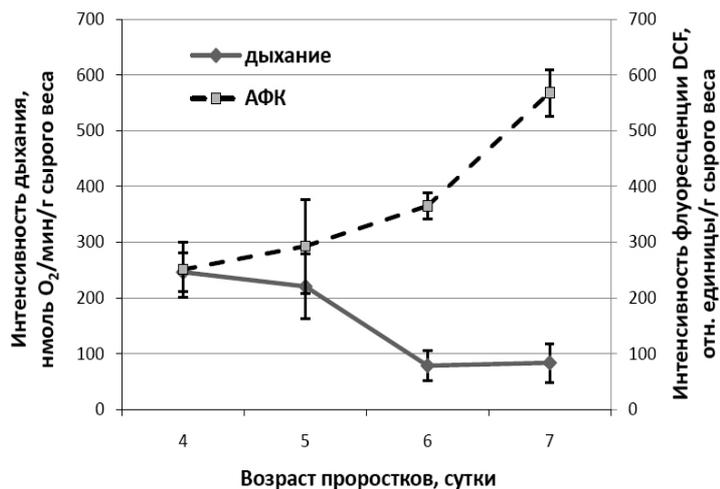


Рис. 3. Изменение интенсивности дыхания и уровня АФК в клетках coleoptилей этилированных проростков кукурузы разного возраста.

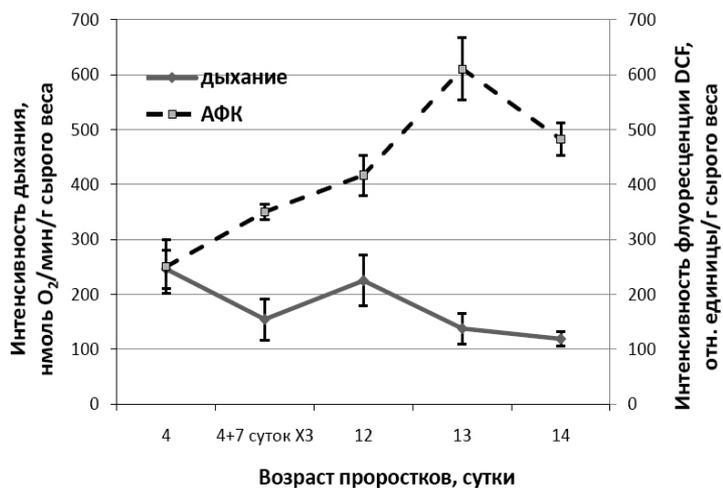


Рис. 4. Изменение интенсивности дыхания и уровня АФК в coleoptилях этилированных проростков кукурузы сразу после холодового закаливания – X3 (8 °C, 7 суток) и через 1-3 суток отрастания при 26 °C (12-14 сутки роста проростков).

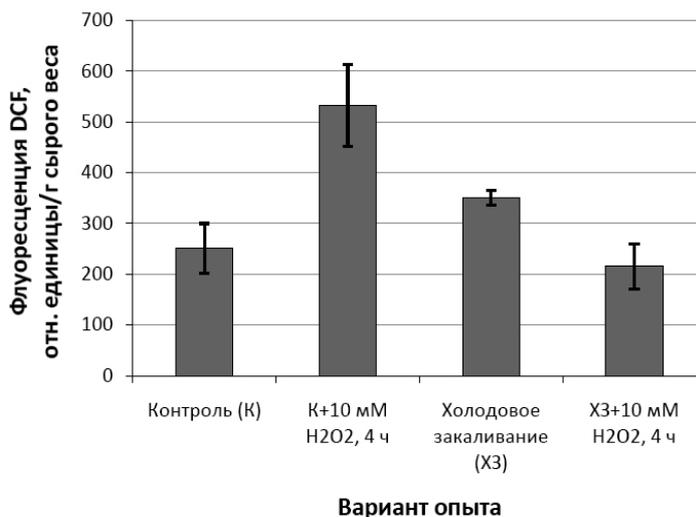


Рис. 5. Содержание АФК в клетках coleoptилей контрольных (К) и холодозакалённых (X3) (8 °C, 7 суток) этилированных проростков кукурузы до обработки и сразу после обработки 10 мМ H₂O₂ в течение 4 ч.

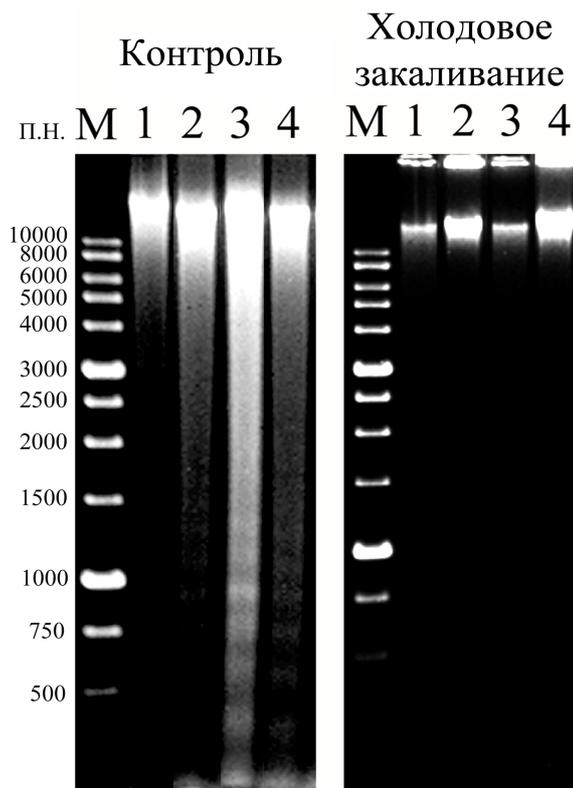


Рис. 6. Электрофорез в 1,5% агарозном геле ДНК из клеток coleoptилей контрольных и холодозакалённых (8 °С, 7 суток) этиолированных проростков кукурузы, подвергнутых обработке перекисью водорода (10 мМ H₂O₂, 4 ч).

Обозначения: Контроль: М – маркеры молекулярного веса ДНК, п.н.; 1 – coleoptиль 4-х суточных проростков кукурузы; 2 – coleoptиль 7-и суточных проростков кукурузы; 3 – coleoptиль 4-х суточных проростков кукурузы сразу после обработки перекисью водорода; 4 – coleoptиль 4-х суточных проростков кукурузы через 3-е суток после обработки перекисью водорода.

Холодовое закаливание: М – маркеры молекулярного веса ДНК, п.н.; 1 – coleoptиль холодозакалённых проростков кукурузы; 2 – coleoptиль холодозакалённых проростков кукурузы через 3-е суток отрастания; 3 – coleoptиль холодозакалённых проростков кукурузы сразу после обработки перекисью водорода; 4 – coleoptиль холодозакалённых проростков кукурузы через 3-е суток после обработки перекисью водорода.

Можно предположить, что снижение содержания АФК в coleoptилях после закаливания проростков будет изменять сроки наступления ПКГ в coleoptиле. Поскольку фрагментация ДНК является одним из ведущих признаков ПКГ у растений (Ванюшин, 2001), мы проанализировали тотальную ДНК из клеток coleoptилей контрольных и закалённых проростков кукурузы, необработанных и обработанных перекисью водорода.

Модифицированная нами методика выделения ДНК позволила получить высокомолекулярную ДНК из coleoptилей 4-х суточных проростков кукурузы (рис. 6), фрагментация которой обнаруживалась в клетках coleoptилей контрольных проростков на 7-е сутки роста (рис. 6), что согласуется с данными по снижению дыхания и повышению АФК в этот период развития проростков (рис. 3). В то же время в клетках coleoptилей закалённых

проростков фрагментацию ДНК не наблюдали ни после холодового воздействия, ни после 3-х суток отрастания при оптимальной температуре (рис. 6). Обработка 10 мМ перекисью водорода в течение 4 ч вызывала фрагментацию ДНК в клетках колеоптилей контрольных проростков, но подобные изменения отсутствовали в колеоптилях закалённых проростков кукурузы (рис. 6).

Таким образом, обработка этиолированных проростков кукурузы перекисью водорода в концентрации 10 мМ вызывает увеличение содержание АФК и фрагментацию тотальной ДНК в колеоптилях через 4 ч воздействия, а предварительное холодовое закаливание предотвращает этот процесс. Фрагментация ДНК свидетельствует о развитии ПКГ в колеоптилях кукурузы, индуцированной обработкой экзогенной перекисью водорода.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение 8266.

ЛИТЕРАТУРА

- Бакеева, Л.Е., Замятнина, В.А., Шорнинг, Б.Ю., Александрюшкина, Н.И., Ванюшин, Б.Ф. (2001) Действие антиоксиданта ионола (ВНТ) на рост и развитие этиолированных проростков пшеницы: контроль за апоптозом, делением клеток, ультраструктурой органелл и дифференцировкой пластид. *Биохимия*, **66**, 1048–1059.
- Ванюшин, Б.Ф. (2001) Апоптоз у растений. *Успехи биологической химии*, **41**, 3–38.
- Замятнина, В.А., Бакеева, Л.Е., Александрюшкина, Н.И., Ванюшин, Б.Ф. (2002) Апоптоз в первом листе у этиолированных проростков пшеницы: влияние антиоксиданта ионола (ВНТ) и перекисей. *Биохимия*, **67**, 253–264.
- Иванов, В.Б. (1974) Клеточные основы роста растений. М.: Наука, 223 с.
- Кирнос, М.Д., Александрюшкина, Н.И., Шорнинг, Б.Ю., Кудряшова, И.Б., Ванюшин, Б.Ф. (1999) Межнуклеосомная фрагментация и синтез ДНК в проростках пшеницы. *Физиол. растений*, **46**, 48–57.
- Медведев, С.С. (2012) Физиология растений: учебник. СПб.: БХВ-Петербург, 512 с.
- Рудашевская, Е.Л., Яковлев, А.Ю., Яковлева, О.В., Шишова, М.Ф. (2009) Изменение активности H^+ -АТФазы плазмалеммы клеток колеоптилей проростков кукурузы разного возраста. *Цитология*, **51**, 149–154.
- Самуилов, В.Д., Киселевский, Д.Б., Синицын, С.В., Шестак, А.А., Лагунова, Е.М., Несов, А.В. (2006) H_2O_2 усиливает CN^- -индуцированный апоптоз в листьях гороха. *Биохимия*, **71**, 481–492.
- Трунова, Т.И. (2007) Растение и низкотемпературный стресс. М.: Наука, 54 с.
- Amor, Y., Chevon, M. and Levine, A. (2000) Anoxia pretreatment protects soybean cells against H_2O_2 -induced cell death: possible involvement of peroxidase and of alternative oxidase. *FEBS Lett.*, **477**, 175–180.
- Balk, J. and Leaver, C.J. (2001) The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome *c* release. *The Plant Cell*, **13**, 1803–1818.
- Gao, C., Zhang, L., Wen, F. and Xing, D. (2008) Sorting out the role of reactive oxygen species during plant programmed cell death induced by ultraviolet C overexposure. *Plant Signaling*

- & *Behavior.*, **3**, 197–198.
- Grabelnych, O.I. (2005) The energetic functions of plant mitochondria under stress. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, **1**, 37–54.
- Houot, V., Etienne, P., Petitot, A.S., Barbier, S., Blein, J.P. and Suty, L. (2001) Hydrogen peroxide induces programmed cell death features in cultured tobacco BY-2 cells, in a dose-dependent manner. *J. Exp. Bot.*, **52**, 1721–1730.
- Jabs, T. (1998) Reactive oxygen intermediates as mediators of PCD in plants and animals. *Biochem. Pharmacol.*, **57**, 231–245.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assemble of the head bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
- Maxwell, D.P., Wang, Y. and McIntosh, L. (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 8271–8276.
- Rikhvanov, E.G., Gamburg, K.Z., Varakina, N.N., Rusaleva, T.M., Fedoseeva, I.V., Tauson, E.L., Stupnikova, I.V., Stepanov, A.V., Borovskii, G.B. and Voinikov, V.K. (2007) Nuclear-mitochondrial cross-talk during heat shock in Arabidopsis cell culture. *Plant J.*, **52**, 763–768.
- Tiwari, B.S., Belenghi, B. and Levine, A. (2002) Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. *Plant Physiol.*, **128**, 1271–1281.
- Vacca, R.A., de Pinto, M.C., Valenti, D., Passarella, S., Marra, L. and de Gara, L. (2004) Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco Bright-Yellow 2 cells. *Plant Physiol.*, **134**, 1100–1112.
- Vanyushin, B.F., Bakeeva, L.E., Zamyatnina, V.A. and Aleksandrushkina, N.I. (2004) Apoptosis in plants: specific features of plant apoptotic cells and effect of various factors and agents. *Int. Rev. Cytol.*, **233**, 135–179.
- Wu, M.Z., Huang, J.J., Xu, S., Ling, T.F., Xie, Y.J. and Shen, W.B. (2011) Haem oxygenase delays programmed cell death in wheat aleurone layers by modulation of hydrogen peroxide metabolism. *J. Exp. Bot.*, **62**, 235–248.