Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2026;30(3):391-402

doi 10.18699/vjgb-26-43

Факторы морозоустойчивости пшеницы – белки-ингибиторы рекристаллизации льда

Н.Е. Коротаева [1, 2], А.В. Федяева [2], К.К. Мусинов [2, 3], А.С. Сурначёв [2, 3], Г.Б. Боровский [1]

[1] Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия
[2] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[3] Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции – филиал Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, р. п. Краснообск, Новосибирская область, Россия

knev73@yandex.ru

Аннотация. Для озимой пшеницы зимостойкость – один из комплексных признаков, определяющих успешное возделывание этой культуры, а отвечающие за нее гены признаны высоко значимыми для селекционных работ. Накопление белков, препятствующих рекристаллизации льда (ice recrystallization inhibition proteins, IRIP), коррелирует с выживаемостью озимой пшеницы, что указывает на важность учета этого признака при получении более морозоустойчивых сортов. Значение IRIP для выживаемости определяется их способностью встраиваться в растущие кристаллы льда, что ограничивает формирование крупных ледяных конгломератов в тканях озимых растений. IRIP пшеницы, накапливающиеся преимущественно в апопласте листьев и узлов кущения в период холодовой акклимации, характеризуются типичной двойственной структурной организацией, определяющей как проявление IRI-активности, так и антипатогенные свойства. Молекула IRIP пшеницы содержит на С-конце консервативный, несколько раз повторяющийся фрагмент NxVx(x)G, формирующий ответственную за связывание с поверхностью льда β-спираль; на N-конце расположены типичная для активируемых патогенами киназ LRR-последовательность, а также направляющий сигнальный пептид. Геном пшеницы содержит до 11 *IRI*-генов. Промотор генов *TaIRI* содержит типичные основные *цис*-активирующие элементы и некоторые элементы, реагирующие на абиотический стресс и гормоны. Изоформы ответственных за защиту от патогенов белков (pathogenesis related proteins, PRP), накапливающихся у озимой пшеницы в период холодовой акклимации, также обладают IRI-активностью. Экспрессия генов IRIP и PRP положительно коррелирует с холодоустойчивостью растений озимой пшеницы. Регуляция генов IRIP и генов PRP, активируемых холодом, согласно современным данным, АБК-независимая, но зависит от присутствия жасмоновой кислоты и от некоторых протеомных факторов транскрипции. В обзоре приведены примеры практического использования изолированных IRIP озимой пшеницы. Вопрос о факторах регуляции активности генов IRIP и активируемых холодом PRP является наименее разработанным на сегодняшний день. Связь этих белков с зимостойкостью пшеницы указывает на перспективность их дальнейшего изучения.

Ключевые слова: белки-ингибиторы рекристаллизации льда; *Triticum aestivum* L.; зимостойкость; регуляция активности генов

Для цитирования: Коротаева Н.Е., Федяева А.В., Мусинов К.К., Сурначёв А.С., Боровский Г.Б. Факторы морозоустойчивости пшеницы – белки-ингибиторы рекристаллизации льда. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(3):391-402. doi 10.18699/vjgb-26-43

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 25-24-00117 (https://rscf.ru/project/25-24-00117/).

Factors of wheat frost hardiness – ice recrystallization inhibitor proteins

N.E. Korotaeva [1, 2], A.V. Fedyaeva [2], K.K. Musinov [2, 3], A.S. Surnachev [2, 3], G.B. Borovskii [1]

[1] Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia
[2] Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
[3] Siberian Research Institute of Plant Production and Breeding – Branch of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russia

knev73@yandex.ru

Abstract. For winter wheat, winter hardiness is one of the complex traits that determine the successful cultivation of this crop, and the responsible genes are recognized as highly significant for breeding work. The accumulation of proteins that prevent ice recrystallization (ice recrystallization inhibition proteins, IRIP) correlates with the survival of winter wheat, which indicates the importance of taking this trait into account when obtaining more frost-resistant varieties. The importance of IRIPs is determined by their ability to integrate into growing ice crystals, which limits the formation of large ice conglomerates in the tissues of winter plants. Wheat IRIPs, which accumulate mainly in the apoplast of leaves and in the crowns during cold acclimation, are characterized by a typical duality of structural

© Коротаева Н.Е., Федяева А.В., Мусинов К.К., Сурначёв А.С., Боровский Г.Б., 2026
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

organization that determines both the manifestation of IRI activity and anti-pathogenic properties. The wheat IRIP molecule contains at the C-terminus a conserved NxVx(x)G fragment that repeats several times, forming a β-helix responsible for binding to the ice surface; at the N-terminus, there is an LRR sequence typical of pathogen-activated kinases, as well as a guiding signal peptide. The wheat genome contains up to eleven *IRI* genes. The *TaIRI* gene promoter contains typical basic *cis*-activating elements and some elements that respond to abiotic stress and hormones. Isoforms of proteins responsible for protecting against pathogens (pathogenesis related proteins, PRP), which accumulate in winter wheat during cold acclimation, also have IRI activity. The expression of the IRIP and PRP genes positively correlates with the cold resistance of winter wheat plants. According to modern data, the regulation of the IRIP genes and cold-activated PRP genes is ABA-independent, but depends on the presence of jasmonic acid and on some proteomic transcription factors. The review provides examples of the practical use of isolated winter wheat IRIPs. The issue of the factors regulating the activity of the IRIP genes and cold-activated PRPs is the least developed to date. The association of these proteins with the winter hardiness of wheat indicates the prospects for their further study.

Key words: ice recrystallization inhibition proteins; *Triticum aestivum* L.; winter hardiness; regulation of gene activity

For citation: Korotaeva N.E., Fedyaeva A.V., Musinov K.K., Surnachev A.S., Borovskii G.B. Factors of wheat frost hardiness – ice recrystallization inhibitor proteins. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov J Genet Breed*. 2026;30(3): 391-402. doi 10.18699/vjgb-26-43

Введение

Озимая пшеница – хозяйственно важный злак, объект особого внимания селекционеров. Эту культуру выращивают по всему миру, в регионах, существенно различающихся по сочетаниям климатических условий, что требует большого разнообразия районированных высокоурожайных сортов. Наличие значительного набора исследованных признаков и определяющих их генов существенно расширяет возможности для районирования пшеницы и повышения ее урожайности в условиях конкретного региона.

Активный вегетативный рост, обеспечивающий высокую урожайность озимой пшеницы, зависит от уровня перезимовки озимых сельскохозяйственных злаков. Признаки, от которых зависит высокая выживаемость при прохождении зимне-весеннего периода, – особенно важные. Зимостойкость – это сложный комплексный признак, позволяющий бороться с несколькими внешними воздействиями, в том числе с промерзанием почвы (Ambroise et al., 2020).

Промерзание почвы, влекущее за собой образование льда в узлах кущения озимой пшеницы, – один из самых значимых повреждающих факторов, снижающих выживаемость и урожайность. Накопление антифризных белков защищает от промерзания узлы кущения и листовую часть растений и является одним из признаков, который свидетельствует о повышении ее морозоустойчивости. Результаты исследований антифризных белков злаковых растений ранее изложены в обзоре J.G. Duman и M.G. Wisniewski (2014). Известные нам статьи, как правило, посвящены холодоустойчивости либо антифризным белкам растений в целом. Имеющаяся к настоящему времени информация об этих белках у пшеницы остается разрозненной.

Целью настоящего обзора стало комплексное освещение имеющихся на сегодняшний день в литературе сведений об антифризных белках мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. В статье будет представлена общая характеристика этих белков, рассмотрена организация молекул на протеомном и геномном уровнях, приведены известные в настоящее время сведения о регуляции активности их генов и практическом применении антифризных белков *T. aestivum*.

Общая характеристика антифризных белков

Антифризные белки (antifreeze proteins, AFP) впервые описаны у антарктических рыб более 50 лет назад (DeVries, Wohlschlag, 1969). С тех пор знания об этих белках существенно расширены, были предложены и апробированы способы их практического применения (Voets, 2017; Liu et al., 2021). В литературных источниках встречается несколько вариантов названий этих белков: «структурирующие лед белки» (ice structuring proteins, ISP) (Kontogiorgos et al., 2007; Wang X. et al., 2024), «связывающиеся со льдом белки» (ice-binding proteins, IBPs) (Janech et al., 2006), «белки термогистерезиса» (thermal hysteresis protein, THP) (Ewart et al., 1999) или «белки-ингибиторы рекристаллизации льда» (ice recrystallization inhibition proteins, IRIP) (Knight et al., 1995). Часть AFP растений является гликозилированными белками, для них принято название «антифризные гликопротеины» (antifreeze glycoproteins, AFGPs) (Griffith et al., 1992). Для AFP пшеницы, гены которых аннотированы, в настоящее время принято название «IRI-белки» (IRI proteins, IRIP), которое в значительной степени соответствует форме активности (Wisniewski et al., 2020).

У растений AFP впервые описаны у паслена (Urrutia et al., 1992) и озимой ржи (Griffith et al., 1992). Позднее было установлено специфическое отличие антифризных белков растений от белков других живых организмов. Для растительных AFP характерна слабая способность к снижению температуры замерзания воды по сравнению с температурой ее плавления – свойство, называемое «термальный гистерезис». Лишь немногие виды растений проявляют термальный гистерезис, доходящий до +2 °C (Jarząbek et al., 2009; Bayer-Giraldi et al., 2011). Это свойство, напротив, очень ярко выражено у AFP животных (Kristiansen et al., 1999, 2011). Для листьев пшеницы термальный гистерезис при измерении в феврале составляет 0.2 °C (Duman, Olsen, 1993).

Рекристаллизация льда происходит на одном из этапов замерзания воды при медленном отводе скрытого тепла, образующегося в результате льдообразования (Пучков, 2017). Способность IRI-белков растений ингибировать рекристаллизацию льда заключается в связывании молекулы белка с поверхностью растущего кристалла льда

и встраивании в этот кристалл, что придает последнему форму шестигранного диска (при низком содержании IRIP в среде) или двусторонней призмы (при высоком содержании IRIP) (Griffith et al., 2005). Важно, что при этом не происходит образования крупных конгломератов льда (Yang et al., 2024), что могло бы повредить живым тканям.

Уровень IRI-активности зависит от количества IRIP в замораживаемом растворе (Regand, Goff, 2006). Способность IRIP растений ингибировать рекристаллизацию льда впервые была описана для ржи (Griffith et al., 1992), затем для других холодоустойчивых видов (Antikainen, Griffith, 1997). Оказалось, что это свойство характерно только для морозоустойчивых растений (Hon et al., 1995; Antikainen, Griffith, 1997).

Как зимующий холодостойкий вид, пшеница содержит гены *IRI*. Накопление IRIP для растений пшеницы особенно актуально поздней осенью и в начале зимнего периода, которым предшествует холодовая акклимация при низких плюсовых температурах. При температурах от –6 до –8 °C у акклиматизированных к холоду растений пшеницы происходит образование льда в межклеточном пространстве сосудистой зоны узла кущения, в который вода в большом количестве перемещается из зоны меристемы стебля. Такое перемещение воды делает зону меристемы более защищенной от повреждения образующимся льдом и предопределяет выживаемость после завершения зимнего периода (Willick et al., 2019). IRIP преимущественно накапливаются в сосудистой зоне узла кущения по сравнению с зоной стеблевой меристемы (Willick et al., 2018).

Важно отметить, что у растений пшеницы минимальная температура, при которой клетки меристемы остаются живыми после перезимовки, близка к показателю LT50 (lethal temperature 50 – температура, при которой наступает гибель 50 % растений исследуемой группы), в то время как накопление IRIP коррелирует с общей выживаемостью в зимних условиях (Chun et al., 1998). В весенний период гены *IRI* оказывают влияние на рост, колошение и начало цветения пшеницы, стимулируя активность генов, отвечающих за яровизацию (Cao et al., 2021).

Снежный покров создает благоприятные условия для поддержания жизни патогенных грибов (Gaudet, Laroche, 1997). В результате тканевых повреждений растущими внутри тканей конгломератами льда возникает высокая вероятность патогенного поражения растений озимой пшеницы в конце зимы после схода снежного покрова. В ответ на патогенное поражение растения синтезируют PR-белки (pathogenesis related proteins, PRP), которые высвобождаются в апопласт при инфицировании и ингибируют ферменты патогенных грибов либо ферментативно разрушают их клеточные стенки (Jain, Khurana, 2018).

Молекулы IRIP пшеницы имеют в своем составе распространенную среди PRP аминокислотную последовательность LRR (leucine-rich repeat) (Tremblay et al., 2005), определяющую PR-активность (Juurakko et al., 2022). Некоторые PRP пшеницы – β-1,3-глюканазы, хитиназы, тауматиноподобные белки, белок-ингибитор полигалактуроназы – обладают антифризной активностью (Hon et al., 1995; Kontogiorgos et al., 2007). В ответ на холод у пшеницы накапливаются специфические изоформы PR-белков, которые функционируют как IRIP и изменяют рост льда во время замораживания, а также обеспечивают устойчивость к патогенам еще до заражения (Griffith, Yaish, 2004).

IRIP пшеницы обнаружены в таких органах растений, как корни, стеблевая часть, листья и узлы кущения (Duman, Olsen, 1993; Willick et al., 2018, 2019; Jin et al., 2022; Vaitkevičiūte et al., 2024). Первоначальная активация генов *TaIRI* после воздействия холодом происходит в листьях, а в последующем – в корнях и стеблях (Jin et al., 2022), что объясняется, по-видимому, первоочередной подверженностью листьев замораживанию из-за надземного положения. Так, транскрипт *TaIRI1* обнаружен в листьях, узле кущения и корнях, в то время как транскрипт *TaIRI2* – только в листьях (Tremblay et al., 2005).

В процессе акклиматизации к холоду у озимых злаков происходит значительное накопление IRIP во внеклеточном пространстве (Antikainen, Griffith, 1997). PRP, гены которых регулируются холодовой акклимацией/деакклимацией, и, вероятно, являющиеся IRIP, могут быть локализованы во внеклеточном пространстве, в плазматической мембране, ядре или цитоплазме (Vaitkevičiūte et al., 2024).

Аминокислотная последовательность IRIP *T. aestivum*

Ранее было показано, что у выявленных зрелых IRIP *T. aestivum* TaIRI-1 и TaIRI-2 с массами 26.8 и 40.7 кД соответственно идентичность составляет 40.4 % (Tremblay et al., 2005). Основным консервативным фрагментом IRIP растений, в том числе пшеницы, признан фрагмент, расположенный на С-конце и состоящий из повторов NxVxxG или NxVxG, где x – неконсервативный участок (Tremblay et al., 2005; Middleton et al., 2012; Jin et al., 2018). Несколько раз повторяющаяся консервативная аминокислотная последовательность С-конца образует бета-спираль, которая посредством двух сторон спирали позволяет IRIP связываться с поверхностями двух образующихся кристаллов льда (Middleton et al., 2009).

Есть предположение, что количество повторов этой консервативной последовательности возникло эволюционно в результате дупликаций в процессе приобретения растениями устойчивости к холоду, и увеличение их количества, вероятно, связано с ростом устойчивости к образованию льда (Sandve et al., 2008). Количество повторов консервативного С-концевого мотива может различаться. Так, у двух IRIP *T. aestivum*, TaIRI-1 и TaIRI-2, обнаружено соответственно 5 и 6 повторов консервативного С-концевого мотива (Tremblay et al., 2005). Позднее в другой работе в шести обнаруженных IRIP *T. aestivum* было выявлено от 9 до 13 повторов (Jin et al., 2018).

На N-концевом участке IRIP расположен фрагмент, богатый лейцином (leucine-rich repeat, LRR) (Jin et al., 2018). Аминокислотная последовательность LRR, которая широко встречается среди эу- и прокариотических организмов, определяет свойство белок-белковых и лиганд-связывающих взаимодействий и включена у растений в молекулы протеинов, синтезируемых в ответ на стресс, вызванный патогенными организмами (McHale et al., 2006). Домен

LRR белков *T. aestivum* TaIRI-1 и TaIRI-2 оказался гомологичен рецепторподобным киназам (Tremblay et al., 2005), задействованным в сигнальной цепочке реакции в ответ на появление молекул-элиситоров патогенных организмов (He, Wu, 2016).

Еще один участок молекул TaIRI оказался гомологичен рецепторной киназе пептидного фитогормона фитосульфокина (Tremblay et al., 2005), участвующего в дифференциации иммунного ответа растений в зависимости от вида патогена (Sauter, 2015). Как протеинкиназы с LRR последовательностью были аннотированы белки *T. aestivum*, кодируемые генами *Tr001_B19* и *Tr001_M19*, имеющими высокое сходство с последовательностями регулируемых холодом IRIP (Monroy et al., 2007). Хотя IRIP, в составе которых присутствует киназный домен, не проявляют протеинкиназной активности (Tremblay et al., 2005), перечисленные факты указывают на общность IRIP и PRP. На N-концевом участке IRIP *T. aestivum* также расположен сигнальный пептид, который направляет белки во внеклеточное пространство или к мембране (Tremblay et al., 2005).

Восемь IRIP пшеницы были распределены на группы в соответствии со сродством их аминокислотных последовательностей. Согласно филогенетическому анализу, аминокислоты, расположенные на C- или N-конце, определяют выделение части IRIP пшеницы в группу 2 (TaIRI-6, TaIRI-7 и TaIRI-8). В группу 1 вошли белки TaIRI-1, TaIRI-3, TaIRI-4 и TaIRI-5. Белок TaIRI-2, имеющий особый LRR-домен, принадлежит к группе 3 (Jin et al., 2018).

Организация генов IRIP *T. aestivum*

Семейство генов *IRI* у холодостойких трав подсемейства Pooideae стало формироваться и приобретать специфические черты около 75 млн лет назад после обособления подсемейства в отдельный таксон (Sandve et al., 2008). Согласно преобладающей гипотезе об эволюции *LRR-IRI*-подобных генов, самый поздний общий предок генов *IRI* у Pooideae – *OsLRR-PSR*-подобный ген, обнаруженный у риса. Этот ген содержал на 5′-конце LRR-последовательность, характерную для рецепторной киназы фитосульфокина; отмечается, что данная последовательность присутствует в генах *TaIRI* (Houde et al., 2006). Предположительно, IRI-кодирующий фрагмент в составе генов *TaIRI* появился в результате инсерционной вставки (Tremblay et al., 2005). Основное расширение группы генов *IRI* у Pooideae произошло около 36 млн лет назад в результате дупликаций специфического *IRI*-участка генов (Sandve et al., 2008). В разных исследованиях у *T. aestivum* обнаружено два (Tremblay et al., 2005), шесть (Jin et al., 2018) или одиннадцать (Sandve et al., 2008) *IRI*-генов, имеющих в составе LRR- и IRI-кодирующие фрагменты. Идентичность генов *TaIRI1* и *TaIRI2* составляет 74.7 и 54.1 % с 5′- и 3′-концов соответственно (Tremblay 2005).

За отдельными исключениями, у однодольных растений распределение генов *IRI* по группам по сходству геномных последовательностей происходит аналогично родовой принадлежности и филогенетическим связям таксонов. Следует отметить, что гены *IRI* у *Triticum* по своей организации имеют тесную связь с генами *IRI* растений рода *Aegilops*, которые являются прародителями аллогексаплоидной пшеницы. Различия в характерных областях последовательностей генов *TaIRI* (*T. aestivum*) были обнаружены с *TdiIRI1* (*T. dicoccoides*), *TmIRI1* (*T. monococcum*) и *TuIRI1* (*T. urartu*), однако не найдено таких различий с *TdIRI1* (*T. durum*) (Jin et al., 2018).

Восемь последовательностей генов *TaIRI* распределяются на четыре группы: по одному гену в группах III и IV (*TaIRI6* и *TaIRI2* соответственно), четыре гена в группе I (*TaIRI1*, *TaIRI3*, *TaIRI4* и *TaIRI5*) и два гена в группе II (*TaIRI7* и *TaIRI8*) (Sandve et al., 2008; Jin et al., 2018).

Промоторы генов *TaIRI* содержат типичные основные *цис*-активирующие элементы и реагирующие на абиотический стресс и гормоны элементы. Три из них отвечают за реакцию на стресс при низкой температуре и засухе (MYB, Mybb и MYC), один – за реакцию на стресс при низкой температуре (LTR). Два элемента участвуют в реакции на действие метилжасмоната (CGTCA- и TGACG-мотив), четыре отвечают за чувствительность к свету (G-Box, 4cl-CMA2b, ATC-мотив и TCT-мотив), один – за чувствительность к абсцизовой кислоте (ABRE). Также промоторы содержат участки ARE, CAT-box, O2-сайт и TC-богатые повторы (Jin et al., 2022).

Картирование генов IRIP и активируемых холодом PRP *T. aestivum*

К настоящему времени получено достаточно много сведений о хромосомной локализации признаков, связанных с морозоустойчивостью пшеницы. Важные для морозоустойчивости пшеницы признаки размещены в QTL-областях (quantitative trait loci – локусы количественных признаков) хромосом 1D, 2A, 2B, 6D и 7B (Båga et al., 2007); 5B и 5D (Chun et al., 1998), 5A, 2D, 2A и 4B (Case et al., 2014); 5A и 4B (Kruse et al., 2017); хромосомах группы 5, 2B и 4B (Sutka, 1994, 2001). Гены *Fr1* и *Fr2* (Frost Resistance), контролирующие морозоустойчивость, были картированы на хромосомах 5A и 5D соответственно (Sutka et al., 1997). Замены хромосом 4A, 6A, 3B, 5D и 3D у неустойчивого к промораживанию сорта Chinese Spring на хромосомы сорта Cheyenne приводили к усиленной аккумуляции белков в апопласте, а замены хромосом 1A, 5A, 4B, 5B, 6B, 1D и 5D – к усилению антифризной активности.

Основные регуляторные гены, повышающие как антифризную активность, так и накопление белков в апопласте клеток листа, содержались в хромосомах 5B и 5D (Chun et al., 1998); в этих же хромосомах, полученных из листьев закаленной к холоду *T. aestivum* сорта Zhoumai, были картированы два гена *TaIRI* (Zheng et al., 2020). Гены *Tr015_M14* и *Tr017_M15*, кодирующие IRIP, у сорта пшеницы Chinese Spring оказались размещены в локусе 4A, при этом для анализа использовали части растений пшеницы, включающих как узел кущения, так и листья (Monroy et al., 2007), хотя на этапе промораживания основное содержание IRIP растений пшеницы приходится на сосудистую зону узла кущения, а меристематическая зона и листья демонстрируют свои специфические особенности ответа на промораживание (Willick et al., 2018).

Поскольку IRIP содержат фрагмент, родственный PRP, обоснованно искать локусы одновременного контроля признаков ответа на холод и на патогенное поражение. QTL-области *T. aestivum*, связанные с устойчивостью к обоим признакам, были идентифицированы на хромосоме 5A и тесно связаны с локусом *Fr2*. Отдельные QTL, относящиеся к устойчивости к промораживанию, обнаружены на хромосомах 5A и 4B; QTL, связанный с устойчивостью к снежной плесени, был идентифицирован на хромосоме 6B (Kruse et al., 2017). Накопление β-1,3-глюканаз, хитиназ, тауматиноподобных белков в условиях промораживания было понижено в растениях с заменами хромосом 2A, 3A, 6B и 7A. Замена хромосомы 7A приводила к значительному удлинению периода промораживания, по истечении которого происходит активация генов PRP (Chun et al., 1998).

Судя по приведенным фактам, у пшеницы состав QTL-областей, ответственных за морозоустойчивость и антифризную активность, отличается для разных сортов. Кроме того, имеет значение, какую часть растения использовали при картировании. Таким образом, анализ организации генома растений пшеницы при исследовании белков с IRI-активностью требуется проводить с учетом этих особенностей.

Влияние низких температур на активность генов IRIP *T. aestivum*

К настоящему времени накоплено достаточно доказательств того, что экспрессия генов антифризных белков *T. aestivum* вызывается охлаждением (см. таблицу) и связана с холодо- и морозоустойчивостью растений этого вида.

Экспрессия четырех генов, *TaIRI*, *TaIRI16*, *TaIRI17*, *TaIRI18*, в тканях стеблей, листьев и корней молодых растений *T. aestivum* индуцировалась холодом (+4 °C, от 2 до 72 ч); среди них индукция гена *TaIRI16* оказалась наиболее существенной (Jin et al., 2018, 2022). Транскрипт *TaIRI1* у мягкой пшеницы начинает накапливаться после воздействия пониженной температуры (+4 °C) и достигает своего максимального уровня после 36 дней акклимации. Дальнейшее воздействие низкой температуры не приводит к более высокому содержанию данного транскрипта. Транскрипт *TaIRI2* также накапливается сразу после начала закаливания, однако его количество достигает максимального значения раньше в период акклимации. После деакклимации уровень транскриптов возвращается к таковому у неакклимированных растений (Tremblay et al., 2005).

При действии закаливания в течение 1–6 суток на проростки пшеницы сортов Jagger и Alabaskaya было выявлено увеличение количества транскриптов генов *Tr001_B19* (GB ID CK197231) и *Tr001_M19* (GB ID CK201227), которые имеют высокое сходство последовательностей с последовательностями IRIP, регулируемых холодом (Monroy et al., 2007). Активность генов *TaIRI*, родственных генам, кодирующим IRIP *Lolium perenne*, усиливается более чем в два раза после помещения закаленных растений *T. aestivum* в условия с отрицательной температурой (Herman et al., 2006). Активность гена-предшественника антифризного белка I (represent sequence ID CK197682) возрастает более чем в 8 раз уже через сутки после начала промораживания молодых растений пшеницы при –5 °C и еще большего значения достигает на третьи сутки промораживания (Kang et al., 2013).

Количество транскриптов *TaIRI-1* и *TaIRI-2* существенно возрастает в результате как постепенного, так и резкого снижения температуры. Их индукция наступает позже, чем индукция генов, кодирующих PRP. Наибольшее накопление происходит в листьях, особенно в случае транскрипта *TaIRI-2* (Winfield et al., 2010).

Значительная часть доказательств участия IRIP в формировании холодо- и морозоустойчивости получена с использованием сортов пшеницы, различающихся по устойчивости к холоду. Усиленную экспрессию *TaIRI-1* и *TaIRI-2* в ответ на понижение температуры наблюдали у озимых сортов пшениц по сравнению с яровыми (Winfield et al., 2010). При всех исследованных режимах охлаждения активность генов *TaIRI* оказалась выше у растений более устойчивого сорта Мироновская 808 (Jin et al., 2022). После первых 6 ч закаливания количество транскриптов генов *Tr015_M14* и *Tr017_M15*, кодирующих антифризные белки, у озимого сорта CDC Clair (LT50 –17 °C) было меньше, чем у ярового сорта Quantum (LT50 –8 °C). Однако начиная с 1 сут закаливания активность этих генов у озимого сорта стала превышать активность у ярового сорта, причем разница для гена *Tr017_M15* оказалась почти троекратной. Экспрессия гена *Tr015_J17*, аннотированного как IRIP-кодирующий, через сутки закаливания при +4 °C была в 2 раза больше у проростков озимого сорта по сравнению с яровым, и эта разница возрастала при увеличении времени закаливания до 14 сут. Количество транскриптов гена *Tr001_B19* у озимого сорта CDC Clair превышало количество транскриптов этого гена у ярового сорта Quantum на всех этапах закаливания (от 6 ч до 14 сут) (Monroy et al., 2007).

Ряд доказательств значения IRIP для холодоустойчивости растений *T. aestivum* был получен с использованием переноса генов. Экспрессия в табаке генов *TaIRI4* и *TaIRI6*, обнаруженных у зимостойкого сорта Мироновская 808, при действии промораживания способствовала снижению проницаемости мембран (при трансформации *TaIRI4*) и снижению активности окисления липидов (при трансформации *TaIRI4* и *TaIRI6*) трансгенных растений (Jin et al., 2018).

Описанные исследования достаточно убедительно доказывают, что экспрессия генов IRIP *T. aestivum* активируется отрицательными и низкими положительными температурами у растений этого вида и вносит вклад в формирование морозоустойчивости.

Регуляция активности генов PRP *T. aestivum* низкими температурами

Ряд генов, кодирующих PRP пшеницы, начинает экспрессию при действии низких температур (см. таблицу). Предположительно, именно такие гены кодируют изоформы PRP с IRI-активностью. M. Houde с коллегами (2006) получили высококачественные EST (expressed sequence tags –

IRIP- и PR-кодирующие гены, активность которых возрастает в результате холодового воздействия

Ген	Условия	Этап развития или часть растения	Литературный источник
	IRIP		
TaIRI4, *TaIRI16*, *TaIRI17*, *TaIRI1*	+4 °C, 2–72 ч	Стебли, листья, корни	Jin et al., 2018, 2022
TaIRI-1	+4 °C, 36 сут	Листья, корни, узлы кущения	Tremblay et al., 2005
TaIRI-2	+4 °C, 6 сут	Листья	
Tr001_B19 (GB ID K197231); *Tr001_M19* (GB ID K201227); *Tr015_M14* (GB ID Y742123); *Tr017_M15* (GB ID Y742648)	+4 °C, 1–14 сут	Проростки	Monroy et al., 2007
Tr015_J17	+4 °C, 1–6 сут	Проростки	
Contig3670_at; *Contig3668_at*; *Contig7221_s_at*	+3 °C, 3 нед. → –3 °C, 6 ч–3 сут	–	Herman et al., 2006
Ta.12663.1.S1_at (CK197682)	–5 °C, 1–3 сут	Листья	Kang et al., 2013
TaIRI-1; *TaIRI-2*	«Шок» (снижение температуры с +16 до +4 °C в течение 2 сут); «акклиматизация» (снижение температуры с +16 до + 4 °C в течение 5–9 нед.)	Листья	Winfield et al., 2010
TaIRI-1	+3 °C, 3 нед.	Листья	Livingston et al., 2021
	PRP		
Pathogenesis-related protein 1-21 (TraesCS7B03G0275300)	+2 °C, 7 нед. → +10 °C, 24 ч–1 нед. → + 2 °C, 24 ч–2 нед.	Узлы кущения	Vaitkevičiūte et al., 2024
	PRP – хитиназы		
*CL386Contig5** *CL386Contig1** *CL1911Contig1** *CL40Contig11** *CL40Contig9** *CL754Contig1**	+4 °C, 14 сут	–	Houde et al., 2006
JC5845	+3 °C, 3 нед. → –3 °C, 6 ч–3 сут	–	Herman et al., 2006
Хитиназа (ID AB029936.1)	–5 °C, 1–3 сут	Листья	Kang et al., 2013
Хитиназа (класс II)	+2 °C, 1–28 сут	Узлы кущения	Gaudet et al., 2000
TaCHT-1	+3 °C, 3 нед.	Листья	Livingston et al., 2021
Хитиназа EC 3.2.1.14 (TraesCS1B03G0732400) (TraesCS3A03G0663800) (TraesCS4D03G0756500)	+2 °C, 7 нед. → +10 °C, 24 ч–1 нед. → + 2 °C, 24 ч–2 нед.	Узлы кущения Листья	Vaitkevičiūte et al., 2024
	PRP – тауматин-подобные белки		
TraesCS5B03G1182300 TraesCS2A03G0227600 TraesCS4A03G0142000 TraesCS4A03G0750400 TraesCS4A03G1252200 TraesCS4D03G0549700 TraesCS5A03G0810000 TraesCS5A03G0043700 TraesCS7B03G1303000 TraesCS7B03G1122500 TraesCS5B03G0034800 TraesCS7A03G1360800 TraesCS6B03G1288000	+2 °C, 7 нед. → +10 °C, 24 ч–1 нед. → + 2 °C, 24 ч–2 нед.	Узлы кущения Листья	Vaitkevičiūte et al., 2024
	PRP – глюканазы		
TaGLB2b	+16 → +4 °C в течение 5–9 нед.	Листья	Winfield et al., 2010
β-1,3-глюканаза	+2 °C, 1–28 сут	Узлы кущения	Gaudet et al., 2000

* При идентификации гомологов по базе данных Arabidopsis TAIR (Hannah et al., 2005).
GB ID – GenBank Identification Description.

экспрессируемые метки последовательностей) из библиотек кДНК пшеницы, связанных с холодовым стрессом. Был получен набор из 75 488 уникальных последовательностей (31 580 контигов и 43 908 синглетов), обогащенный генами, регулируемыми стрессом. Среди них оказались EST, которые содержат контиги, кодирующие хитиназы, β-1,3-глюканазу и тауматиноподобные белки. Пятнадцать последовательностей из них были аннотированы как предшественники или собственно хитиназы, шесть из них активировались холодом. Количество транскриптов гена *TaGLB2b*, кодирующего глюканазу, значительно возрастает только в результате постепенного снижения температуры; при шоковом снижении температуры количество данных транскриптов не увеличивается. Их индукция наступает раньше, чем у генов *TaIRI*, и происходит между третьей и пятой неделями после начала охлаждения (Winfield et al., 2010).

Активность гена *JC5845*, кодирующего хитиназу, усиливается более чем в 2 раза после помещения закаленных растений *T. aestivum* в условия с отрицательной температурой (Herman et al., 2006). Ген, кодирующий хитиназу 3 (represent sequence ID AB029936.1), оказался одним из генов, активность которых возросла более чем в 8 раз в ответ на промораживание молодых растений пшеницы при –5 °C. Уровень его активности существенно возрастал в зависимости от дозы воздействия, поскольку при измерении уровня экспрессии на 1-е и 3-и сутки промораживания разница в уровне экспрессии была почти в 20 раз (Kang et al., 2013).

Зафиксированы различия в уровне экспрессии генов PRP при действии охлаждения на растения сортов, различающихся по PR- и морозоустойчивости. При изучении активности геномов ярового и озимого сортов пшеницы в ответ на холодовое закаливание (+4 °C, продолжительность от 6 ч до 14 суток) не обнаружено существенных различий в активности генов, кодирующих тауматин или хитиназу. Но рост количества транскриптов гена *Tr017_C17*, кодирующего предшественник хитиназы II, в ответной реакции на закаливание оказался выше у озимого сорта (Monroy et al., 2007).

Ряд генов хитиназы и β-1,3-глюканазы регулируется осенней холодовой акклимацией: их экспрессия происходит поздней осенью, достигает высоких уровней к середине зимы, затем снижается и доходит до максимальных значений весной. При действии холодового закаливания транскрипты гена β-1,3-глюканазы слабо экспрессируются при кратковременном воздействии, при более длительном воздействии их экспрессия существенно усиливается и остается на том же уровне после возвращения условий к контрольным. Ген, кодирующий хитиназу, начинает активно экспрессироваться сразу после начала охлаждения, уровень его экспрессии снижается после возвращения условий к контрольным. Различия в уровне экспрессии этих генов у устойчивого и менее устойчивого к поражению снежной плесенью сортов начинали проявляться в условиях осенней холодовой акклимации; уровень экспрессии был выше у сорта, более устойчивого к поражению (Gaudet et al., 2000).

D.P. Livingston с коллегами обнаружили, что холодовое закаливание молодых растений пшеницы способствует усилению экспрессии генов, кодирующих хитиназу-1 (TaCHT-1) и IRIP. Однако связь между температурой замерзания листьев, полученных от предварительно закаленных растений, и уровнем экспрессии этих генов оказалась отрицательной: их экспрессия была ниже в листьях, замерзавших при более низкой температуре (Livingston et al., 2021).

Известно, что антифризные белки растений понижают температуру замерзания лишь на долю градуса (Tremblay et al., 2005), поэтому отсутствие прямой положительной связи между уровнем экспрессии генов *TaIRI-1* и *TaCHT-1* и температурой замерзания листьев выглядит объяснимым. Уровни экспрессии генов *TaIRI-1* и *TaCHT-1* положительно коррелируют с численностью и сложностью бактериальных и грибковых сообществ, что объясняется, по-видимому, структурной близостью антифризных белков с белками ответа на патогенное заражение и сходными с последними функциями.

Перечисленные факты указывают на существование дифференциальной экспрессии генов PRP, регулирующей их активность в зависимости от холодоустойчивости сорта пшеницы, продолжительности воздействия, его направления, которая имеет также органоспецифические особенности.

G. Vaitkevičiūte с коллегами (2024) исследовали влияние холодовой деакклимации и повторной акклиматизации к холоду на активность генома у устойчивого/чувствительного к промораживанию сортов *T. aestivum*. Показано, что значительное число генов, связанных с ответом на патогенное поражение, реагировало как на раззакаливание, так и на повторную холодовую обработку, при этом на активность генов влияла продолжительность обработок. Так, и при кратковременном, и при длительном раззакаливании узлов кущения произошло снижение активности гена тауматин-подобного белка, тогда как при более длительной обработке также снизилась активность генов, кодирующих фермент хитиназу.

В ходе повторного закаливания наблюдалась дифференциальная экспрессия генов, кодирующих PRP с идентичной активностью. Так, среди генов, кодирующих в узлах кущения хитиназу, при повторном закаливании часть генов снижала активность, тогда как активность других генов возрастала. Для генов тауматин-подобного белка при повторном закаливании узлов кущения была показана дифференциальная активность в зависимости не только от направления изменения их активности, но и от продолжительности этой обработки.

Гораздо большее разнообразие генов, кодирующих тауматин-подобные белки и хитиназы, в листьях *T. aestivum*, по сравнению с узлами кущения, отвечало дифференциальной экспрессией на раззакаливание и повторное закаливание в зависимости от продолжительности этих воздействий. В узлах кущения устойчивого сорта Lakaja DS активность генов, связанных с ответом на заражение, меньше регулировалась флуктуациями температур по сравнению с менее устойчивым сортом KWS Ferrum. В ли-

стьях у более устойчивого сорта, напротив, регуляции под действием температурных флуктуаций подвергалось большее количество генов по сравнению с неустойчивым сортом, причем значительным числом из них были гены тауматин-подобных белков (Vaitkevičiūte et al., 2024). Исследование раскрывает связь холодостойкости пшеницы с транскрипцией генов PRP, которые, предположительно, обладают IRI-активностью.

Таким образом, можно заключить, что гены пшеницы, кодирующие PRP, активируются холодом и повторной холодовой акклимацией и вносят вклад в усиление холодо- и морозоустойчивости. При этом гены, относящиеся к одной и той же подгруппе PRP (хитиназы, тауматин-подобные белки), регулируются дифференцированно, и не все из них активируются охлаждением.

Пути регуляции экспрессии генов IRIP и активируемых холодом PRP *T. aestivum*

Показано, что *IRI*-гены пшеницы начинают экспрессироваться при понижении температуры. Активность генов растений, отвечающих за устойчивость к охлаждению, регулируется АБК-зависимым и АБК-независимым путями. Из АБК-независимых регуляторных путей основным является сигнальная цепь ICE-CBF-COR: регулируемые холодом гены (COld Related, COR) активируются связывающимся с С-повтором фактором транскрипции (C-repeat binding factor, CBF), активность последнего контролируется собственным индуктором (inducer of CBF expression, ICE) (Chinnusamy et al., 2003). Роль данного пути в активизации генов адаптации к холоду у *T. aestivum* общепризнана, однако регуляция *IRI*-генов группой транскрипционных факторов ICE-CBF-COR не доказана, хотя ICE *T. aestivum* связываются с MYC-элементами (Badawi et al., 2008), присутствующими в промоторах *TaIRI* (Jin et al., 2022). Мы обнаружили одно исследование, указывающее на существование связи пути ICE-CBF-COR с *IRI* у *T. aestivum* (Tchagang et al., 2017).

Другой известный путь регуляции адаптационных изменений в ответ на холод является АБК-зависимым (Xue-Xuan et al., 2010). Несмотря на то что известна важная роль АБК в формировании устойчивости *T. aestivum* к холоду и заморозкам (Zheng et al., 2020), часть факторов, ответственных за холодо- и морозоустойчивость, активируется независимо от АБК (Wang W. et al., 2017). Участие АБК в активации генов *TaIRI* и *PRP* также не доказано, хотя промоторы генов *TaIRI* содержат элементы, отвечающие за чувствительность к абсцизовой кислоте (Jin et al., 2022). Активации генов *TaIRI1* и *TaIRI2* после опрыскивания 6-суточных проростков *T. aestivum* абсцизовой кислотой не обнаружено (Tremblay et al., 2005).

Рост содержания АБК в листьях и узлах кущения *T. monococcum* происходит на первом этапе нелетального холодового воздействия; с начала третьего дня воздействия наступает этап адаптации, при этом снижение содержания АБК совпало с ростом содержания салициловой кислоты. Таким образом, возможно, что в холодный период влияние АБК на экспрессию генов *TaIRI* и активируемых холодом PRP ограничивается продолжительностью воздействия и АБК не включается в адаптационный ответ на поздних фазах, когда возникает необходимость в накоплении IRIP, при этом роль управления адаптивными изменениями переходит к другим факторам (Vanková et al., 2014).

IRIP пшеницы структурно близки к PRP, а ее PRP (β-1,3-глюканазы, тауматин, хитиназы) дополнительно обладают свойствами антифризных белков. Обоснованным кажется предположение, что факторами транскрипции генов группы растительных антифризных белков могут быть PR-связанные факторы, в частности группа факторов транскрипции WRKY (Pandey, Somssich, 2009). Ряд фактов косвенно указывает на такую возможность. Например, с экспрессией генов WRKY связано повышение устойчивости растений пшеницы на начальном этапе холодового закаливания (Talanova et al., 2008; Winfield et al., 2010); ряд генов WRKY активируется в ответ на охлаждение только у озимой пшеницы (Winfield et al., 2010); рост активности генов WRKY происходит при отрицательных температурах и зависит от продолжительности воздействия (Herman et al., 2006). Дополнительно некоторые гены, кодирующие глюканазы, хитиназы и тауматиноподобные белки пшеницы, регулируются совместно с генами, кодирующими факторы транскрипции WRKY (Winfield et al., 2010); ген *TaWRKY1* активируется как атакой патогена, так и охлаждением (Wang W. et al., 2017), а некоторые WRKY сами проявляют свойства IRIP (Huang, Duman, 2002).

Обнаружено, что в регуляции генов антифризных белков участвуют фитогормоны, активирующие ответ на действие патогенов – этилена, жасмоновой и салициловой кислот. Эти фитогормоны также задействованы в регуляции активности *IRI*-генов пшеницы (Tremblay et al., 2005), хотя их роль в формировании холодо- и морозоустойчивости пшеницы не всегда подтверждается однозначно (Kurepin et al., 2013), а для этилена было показано, что с устойчивостью пшеницы к холоду он не связан (Macháčcková et al., 1989).

Экспрессия генов *TaIRI17*, *TaIRI18* и в особенности *TaIRI16* в тканях стеблей, листьев и корней молодых растений *T. aestivum* усиливалась в побегах, корнях и листьях молодых растений пшеницы при экзогенной обработке метилжасмонатом одновременно с охлаждением (+4 °C, 24 ч) (Jin et al., 2022). На активность промоторов генов *TaIRI* также оказывал стимулирующее влияние экзогенный метилжасмонат (Jin et al., 2022). В то же время жасмоновая кислота по-разному влияла на экспрессию генов *TaIRI1* и *TaIRI2* у 6-суточных проростков морозоустойчивого сорта *T. aestivum*: опрыскивание раствором жасмоновой кислоты приводило к индукции экспрессии гена *TaIRI1*, но не *TaIRI2* (Tremblay et al., 2005). Анализ активности мотивов промоторов генов *TaIRI* в табаке и оценка их экспрессии в *A. thaliana* после соответствующих трансформаций показали, что мотивы MYB, Mybb, MYC, CGTCA и TGACG из промотора TaIRIp1 обладали значительной активностью и индуцировались обработкой холодом и метилжасмонатом (Jin et al., 2022).

Роль салициловой кислоты в регуляции генов антифризных белков в настоящее время не подтверждена однозначно. Не выявлено активации генов *TaIRI1* и *TaIRI2* после опрыскивания 6-суточных проростков морозоустойчивого сорта *T. aestivum* салициловой кислотой (Tremblay et al., 2005). Обработка молодых растений пшеницы

сорта Yangmai 16 раствором, содержащим салициловую кислоту, с последующим 6-суточным промораживанием в полевых условиях при средней температуре +5.3 °C и минимальной температуре, достигавшей –7 °C, не привела к росту экспрессии гена *IRI2* (AY968589) по сравнению с такой обработкой в условиях контрольной температуры (среднее значение +12 °C) (Wang W. et al., 2021). При этом промораживание в отсутствие орошения раствором салициловой кислоты приводило к двукратному росту уровня экспрессии этого гена по сравнению с контрольными условиями. Как отмечают авторы исследования, предыдущие эксперименты продемонстрировали, что предварительная обработка салициловой кислотой может повышать уровень экспрессии гена *TaIRI2* в течение 48-часовой низкотемпературной обработки (Wang W. et al., 2020). Таким образом, вероятно, что регуляция салициловой кислотой экспрессии гена *TaIRI2* зависела от продолжительности воздействия, но это предположение требует дополнительных исследований.

Этилен участвует в регуляции антифризной активности у озимой ржи в ответ на холод и засуху, при этом в апопласте листьев озимой ржи происходит накопление β-1,3-глюканаз, хитиназ и тауматин-подобных белков (Yu et al., 2001). У *T. aestivum* опрыскивание 6-суточных проростков морозоустойчивого сорта раствором этилена приводило к дифференциальной регуляции генов *TaIRI1* и *TaIRI2*: этилен индуцировал экспрессию гена *TaIRI1*, но не *TaIRI2* (Tremblay et al., 2005). Однако связь этилена с формированием холодоустойчивости пшеницы оказалась отрицательной (Macháčcková et al., 1989).

В целом сведений об участии факторов транскрипции в регуляции экспрессии генов антифризных белков пока немного, а информация об участии фитогормонов в их регуляции достаточно противоречива. По-видимому, для регуляции фитогормонами большое значение имеют продолжительность, интенсивность и этап холодового воздействия. Также остается неясным, почему исследованные фитогормоны, несмотря на способность активировать гены *TaIRI*, не усиливают устойчивость растений пшеницы к холоду. Эта сторона реализации антифризной активности нуждается в дополнительных исследованиях.

Практическое применение IRIP и активируемых холодом PRP *T. aestivum*

Использование растительных AFP ограничено их сниженной способностью к развитию термального гистерезиса по сравнению с AFP животных и обосновано в большей степени их IRI-активностью. Важным направлением практического применения AFP могло бы быть получение более морозоустойчивых растений и сортов. Хотя в исследовательских работах перенос генов антифризных белков пшеницы приводил к обнадеживающим результатам (Jin et al., 2022), такое применение знаний об IRIP пшеницы на практике пока ограничено.

Основные направления практического применения растительных AFP на сегодняшний день – это криоконсервация в медицине и пищевой промышленности. AFP природного происхождения менее токсичны, чем используемый в настоящее время диметилсульфоксид (Chow-Shi-Yée et al., 2020), что делает их весьма перспективными криоконсервантами. Неочищенный экстракт из проростков пшеницы защищает гепатоциты крыс во время криоконсервации. Улучшить эффект удалось после дополнительной очистки экстракта или при применении рекомбинантного белка TaIRI-2, что обеспечило более длительное хранение гепатоцитов и восстановление большого количества здоровых клеток после размораживания с сохранением их активности (Grondin et al., 2009).

При использовании рекомбинантного белка TaIRI-2 для криоконсервации секретирующих инсулин клеток INS832/13 оказалось, что TaIRI-2 способен проникать внутрь этих клеток, а также внутрь гепатоцитов, что, по-видимому, существенно улучшает сохранность клеток после размораживания и снижает вероятность их гибели (Chow-Shi-Yée et al., 2016). Важно учитывать, что использование криоконсерваторов растительного происхождения может обладать иммуногенностью, индуцирующей нежелательные иммунные и аллергические реакции, это является существенным ограничением в их использовании для медицинской криоконсервации (Костяев и др., 2016).

В пищевой промышленности природные AFP широко применяются при производстве мороженого, для чего было получено несколько патентов, в том числе патент на использование AFP озимой ржи (Boonsupthip, Lee, 2003). AFP, содержащиеся в экстракте акклиматизированной к холоду пшеницы, существенно улучшали текстуру мороженого, шоковое замораживание не повлияло на это свойство (Regand, Goff, 2006). Добавление к хлебному тесту AFP, экстрагированных из муки озимой пшеницы с повышенной морозоустойчивостью, снижает текучесть воды и ее миграцию в тесте во время цикла замораживания-размораживания, что позволяет сохранить внутреннюю структуру и клейковинную сетку теста, повышает вязкость и эластичность и улучшает текстурные свойства теста (Wang X. et al., 2024).

Прямое применение сырого растительного экстракта в пищевой промышленности предпочтительнее использования чистого вещества из-за трудоемкости получения последнего и его низкого выхода, но использование концентрированного экстракта проблематично из-за наличия ферментов, активность которых может ухудшать вкусовые или текстурные качества продукта. Избавление экстракта от нежелательной ферментативной активности происходит путем нагревания, таким образом, термоустойчивость должна быть обязательным свойством природных AFP, используемых в пищевой промышленности. Перспективный с этой точки зрения термостабильный тауматин-подобный AFP обнаружен в составе экстракта из апопласта листьев акклиматизированной к холоду *T. aestivum* (Kontogiorgos et al., 2007).

Заключение

Связь экспрессии генов антифризных белков (с последующим накоплением соответствующих продуктов) с усилением морозоустойчивости озимой пшеницы показана достаточно убедительно в ряде модельных экспериментов.

Выявлено, что накопление апопластных и антифризных белков коррелирует с выживаемостью растений озимой пшеницы в полевых условиях (Chun et al., 1998). Однако остается неизвестным, насколько велико значение антифризной активности для выживаемости растений озимой пшеницы по сравнению с другими известными факторами (например, накоплением свободного пролина и олигосахаридов, глубиной залегания узла кущения). Следовательно, пока неясны обоснования для включения признака накопления антифризных белков в направленные селекционные мероприятия. AFP пшеницы проявляют двойную активность (антифризную и антипатогенную), такая активность, с одной стороны, затрудняет описание вклада антифризных белков в выживаемость пшеницы, с другой – делает наличие признака накопления антифризного белка особенно ценным, поскольку он определяет присутствие удвоенного числа факторов устойчивости и урожайности.

В преобладающем большинстве модельных экспериментов оценивали влияние на экспрессию генов IRIP и активируемых холодом PRP низких положительных температур; единичные исследования выявляли влияние отрицательной температуры (Herman et al., 2006; Kang et al., 2013; Willick et al., 2018). Таким образом, исследователи могут сделать вывод о связи экспрессии соответствующих генов только с холодоустойчивостью пшеницы. Но необходимость в этих белках возникает именно при наступлении отрицательных температур. Имитация полевых условий с отрицательными температурами в модельных экспериментах могла бы не только значительно углубить знания об экспрессии генов IRIP и PRP, но и приблизить к пониманию того, каким образом реализуются их функции в действительности.

Важной задачей остается выяснение механизмов регуляции активности генов антифризных белков, поскольку в общем и целом картина их регуляции неясна, особенно это касается белковых факторов экспрессии генов. Неизвестны в точности закономерности гормональной регуляции AFP пшеницы. Весьма вероятно, что двойственная природа растительных AFP определила существование регуляторной системы управления генами AFP, когда в ней могут быть задействованы сигнальные пути ответа как на биотический, так и на абиотический стрессы, что требует особенно тщательного исследования.

Результаты эффективного практического применения антифризных белков пшеницы, получение доказательств связи между холодоустойчивостью, экспрессией генов и накоплением этих белков у озимой пшеницы говорят в пользу необходимости продолжения исследований этой группы белков низкотемпературной адаптации.

Список литературы / References

Костяев А.А., Мартусевич А.К., Андреев А.А. Токсичность криопротекторов и криоконсервантов на их основе для компонентов крови и костного мозга (обзорная статья). *Научное обозрение. Медицинские науки.* 2016;6:54-74
[Kostyaev A.A., Martusevich A.K., Andreev A.A. Toxicity of cryoprotectants and cryoconservants on their basis for blood components and bone marrow (review article). *Nauchnoe Obozrenie. Meditsinskie Nauki = Scientific Review. Medical Sciences.* 2016;6:54-74 (in Russian)]

Пучков Е.О. Биогенное управление образованием льда. *Природа*. 2017;2:27-37
[Puchkov E.O. Biogenic control of ice formation. *Priroda.* 2017;2:27-37 (in Russian)]

Ambroise V., Legay S., Guerriero G., Hausman J.F., Cuypers A., Sergeant K. The roots of plant frost hardiness and tolerance. *Plant Cell Physiol*. 2020;61(1):3-20. doi 10.1093/pcp/pcz196

Antikainen M., Griffith M. Antifreeze protein accumulation in freezing-tolerant cereals. *Physiol Plant.* 1997;99(3):423-432. doi 10.1111/j.1399-3054.1997.tb00556.x

Badawi M., Reddy Y.V., Agharbaoui Z., Tominaga Y., Danyluk J., Sarhan F., Houde M. Structure and functional analysis of wheat ICE (inducer of CBF expression) genes. *Plant Cell Physiol.* 2008;49(8):1237-1249. doi 10.1093/pcp/pcn100

Båga M., Chodaparambil S.V., Limin A.E., Pecar M., Fowler D.B., Chibbar R.N. Identification of quantitative trait loci and associated candidate genes for low-temperature tolerance in cold-hardy winter wheat. *Funct Integr Genomics.* 2007;7(1):53-68. doi 10.1007/s10142-006-0030-7

Bayer-Giraldi M., Weikusat I., Besir H., Dieckmann G. Characterization of an antifreeze protein from the polar diatom *Fragilariopsis cylindrus* and its relevance in sea ice. *Cryobiology*. 2011;63(3):210-219. doi 10.1016/j.cryobiol.2011.08.006

Boonsupthip W., Lee T.-C. Application of antifreeze protein for food preservation: effect of type III antifreeze protein for preservation of gel-forming of frozen and chilled actomyosin. *J Food Sci*. 2003;68(5):1804-1809. doi 10.1111/j.1365-2621.2003.tb12333.x

Cao Y., Hu G., Zhuang M., Yin J., Wang X. Molecular cloning and functional characterization of *TaIRI9* gene in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Gene*. 2021;791:145694. doi 10.1016/j.gene.2021.145694

Case A.J., Skinner D.Z., Garland-Campbell K.A., Carter A.H. Freezing tolerance-associated quantitative trait loci in the brundage × coda wheat recombinant inbred line population. *Crop Sci.* 2014;54(3):982-992. doi 10.2135/cropsci2013.08.0526

Chinnusamy V., Ohta M., Kanrar S., Lee B.H., Hong X., Agarwal M., Zhu J.K. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev*. 2003;17(8):1043-1054. doi 10.1101/gad.1077503

Chow-Shi-Yée M., Briard J.G., Grondin M., Averill-Bates D.A., Ben R.N., Ouellet F. Inhibition of ice recrystallization and cryoprotective activity of wheat proteins in liver and pancreatic cells. *Protein Sci.* 2016;25(5):974-986. doi 10.1002/pro.2903

Chow-Shi-Yée M., Grondin M., Ouellet F., Averill-Bates D.A. Control of stress-induced apoptosis by freezing tolerance-associated wheat proteins during cryopreservation of rat hepatocytes. *Cell Stress Chaperones*. 2020;25(6):869-886. doi 10.1007/s12192-020-01115-y

Chun J., Yu X., Griffith M. Genetic studies of antifreeze proteins and their correlation with winter survival in wheat. *Euphytica.* 1998;102:219-226. doi 10.1023/A:1018333730936

DeVries A.L., Wohlschlag D.E. Freezing resistance in some Antarctic fishes. *Science.* 1969;163(3871):1073-1075. doi 10.1126/science.163.3871.1073

Duman J.G., Olsen T.M. Thermal hysteresis protein activity in bacteria, fungi, and phylogenetically diverse plants. *Cryobiology*. 1993;30(3):322-328. doi 10.1006/cryo.1993.1031

Duman J.G., Wisniewski M.J. The use of antifreeze proteins for frost protection in sensitive crop plants. *Env Exp Bot*. 2014;106:60-69. doi 10.1016/j.envexpbot.2014.01.001

Ewart K.V., Lin Q., Hew C.L. Structure, function and evolution of antifreeze proteins. *Cell Mol Life Sci*. 1999;55(2):271-283. doi 10.1007/s000180050289

Gaudet D.A., Laroche A. Winter survival of cereals parasitized by Snow Mold. In: Li P.H., Chen T.H.H. (Eds) Plant Cold Hardiness. Boston: Springer, 1997;331-342. doi 10.1007/978-1-4899-0277-1_31

Gaudet D.A., Laroche A., Frick M., Davoren J., Puchalski B., Ergon Å. Expression of plant defence-related (PR-protein) transcripts during hardening and dehardening of winter wheat. *Physiol Mol Plant Pathol.* 2000;57(1):15-24. doi 10.1006/pmpp.2000.0275

Griffith M., Yaish M.W. Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends Plant Sci.* 2004;9(8):399-405. doi 10.1016/j.tplants.2004.06.007

Griffith M., Ala P., Yang D.S., Hon W.C., Moffatt B.A. Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves. *Plant Physiol*. 1992;100(2):593-596. doi 10.1104/pp.100.2.593

Griffith M., Lumb C., Wiseman S.B., Wisniewski M., Johnson R.W., Marangoni A.G. Antifreeze proteins modify the freezing process in planta. *Plant Physiol*. 2005;138(1):330-340. doi 10.1104/pp.104.058628

Grondin M., Hamel F., Averill-Bates D.A., Sarhan F. Wheat proteins improve cryopreservation of rat hepatocytes. *Biotechnol Bioeng*. 2009;103(3):582-591. doi 10.1002/bit.22270

Hannah M.A., Heyer A.G., Hincha D.K. A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet*. 2005;1(2):e26. doi 10.1371/journal.pgen.0010026

He K., Wu Y. Receptor-like kinases and regulation of plant innate immunity. *Enzymes*. 2016;40:105-142. doi 10.1016/bs.enz.2016.09.003

Herman E.M., Rotter K., Premakumar R., Elwinger G., Bae H., Ehler-King L., Chen S., Livingston D.P. 3rd. Additional freeze hardiness in wheat acquired by exposure to –3 degrees C is associated with extensive physiological, morphological, and molecular changes. *J Exp Bot.* 2006;57(14):3601-3618. doi 10.1093/jxb/erl111

Hon W.C., Griffith M., Mlynarz A., Kwok Y.C., Yang DSC. Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol.* 1995;109(3):879-889. doi 10.1104/pp.109.3.879

Houde M., Belcaid M., Ouellet F., Danyluk J., Monroy A.F., Dryanova A., Gulick P., Bergeron A., Laroche A., Links M.G., MacCarthy L., Crosby W.L., Sarhan F. Wheat EST resources for functional genomics of abiotic stress. *BMC Genomics*. 2006;7:149. doi 10.1186/1471-2164-7-149

Huang T., Duman J.G. Cloning and characterization of a thermal hysteresis (antifreeze) protein with DNA-binding activity from winter bittersweet nightshade, *Solanum dulcamara*. *Plant Mol Biol*. 2002;48(4):339-350. doi 10.1023/A:1014062714786

Jain D., Khurana J.P. Role of pathogenesis-related (PR) proteins in plant defense mechanism. In: Singh A., Singh I. (Eds) Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction. Singapore: Springer, 2018;265-281. doi 10.1007/978-981-10-7371-7_12

Janech M.G., Krell A., Mock T., Raymond J.A. Ice-binding proteins from sea ice diatoms (Bacillariophyceae). *J Phycol*. 2006;42(2):410-416. doi 10.1111/j.1529-8817.2006.00208.x

Jarząbek M., Pukacki P.M., Nuc K. Cold-regulated proteins with potent antifreeze and cryoprotective activities in spruces (*Picea* sp.). *Cryobiology*. 2009;58(3):268-274. doi 10.1016/j.cryobiol.2009.01.007

Jin Y.N., Bai L.P., Guan S.X., Zhong M., Ma H., Wang S., Guo Z.F. Identifcation of an ice recrystallisation inhibition gene family in winter-hardy wheat and its evolutionary relationship to other members of the *Triticeae*. *J Agron Crop Sci.* 2018;204(4):400-413. doi 10.1111/jac.12270

Jin Y., Ding X., Li J., Guo Z. Isolation and characterization of wheat ice recrystallisation inhibition gene promoter involved in low temperature and methyl jasmonate responses. *Physiol Mol Biol Plants.* 2022;28(11-12):1969-1979. doi 10.1007/s12298-022-01257-6

Juurakko C.L., diCenzo G.C., Walker V.K. *Brachypodium* antifreeze protein gene products inhibit ice recrystallisation, attenuate ice nucleation, and reduce immune response. *Plants.* 2022;11(11):1475. doi 10.3390/plants11111475

Kang G., Li G., Yang W., Han Q., Ma H., Wang Y., Ren J., Zhu Y., Guo T. Transcriptional profile of the spring freeze response in the leaves of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Acta Physiol Plant.* 2013;35(02):575-587. doi 10.1007/s11738-012-1099-3

Knight C.A., Wen D., Laursen R.A. Nonequilibrium antifreeze peptides and the recrystallization of ice. *Cryobiology*. 1995;32(1):23-34. doi 10.1006/cryo.1995.1002

Kontogiorgos V., Regand A., Yada R., Goff H.D. Isolation and characterization of ice structuring proteins from cold-acclimated winter wheat grass extract for recrystallization inhibition in frozen foods. *J Food Biochem*. 2007;31(2):139-160. doi 10.1111/j.1745-4514.2007.00112.x

Kristiansen E., Pedersen S.A., Ramløv H., Zachariassen K.E. Antifreeze activity in the cerambycid beetle Rhagium inquisitor. *J Comp Physiol B.* 1999;169:55-60. doi 10.1007/s003600050193

Kristiansen E., Ramløv H., Højrup P., Pedersen S.A., Hagen L., Zachariassen K.E. Structural characteristics of a novel antifreeze protein from the longhorn beetle *Rhagium inquisitor*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2011;41(2):109-117. doi 10.1016/j.ibmb.2010.11.002

Kruse E.B., Carle S.W., Wen N., Skinner D.Z., Murray T.D., Garland-Campbell K.A., Carter A.H. Genomic regions associated with tolerance to freezing stress and snow mold in winter wheat. *G3* (*Bethesda*). 2017;7(3):775-780. doi 10.1534/g3.116.037622

Kurepin L.V., Dahal K.P., Savitch L.V., Singh J., Bode R., Ivanov A.G., Hurry V., Hüner N.P. Role of CBFs as integrators of chloroplast redox, phytochrome and plant hormone signaling during cold acclimation. *Int J Mol Sci*. 2013;14(6):12729-12763. doi 10.3390/ijms140612729

Liu X., Pan Y., Liu F., He Y., Zhu Q., Liu Z., Zhan X., Tan S. A review of the material characteristics, antifreeze mechanisms, and applications of cryoprotectants (CPAs). *J Nanomater*. 2021;2021(1):9990709. doi 10.1155/2021/9990709

Livingston D.P. 3rd, Bertrand A., Wisniewski M., Tisdale R., Tuong T., Gusta L.V., Artlip T. Factors contributing to ice nucleation and sequential freezing of leaves in wheat. *Planta*. 2021;253(6):124. doi 10.1007/s00425-021-03637-w

Macháčcková I., Hanisova A., Krekule J. Levels of ethylene, ACC, MACC, ABA and proline as indicators of cold hardening and frost resistance in winter wheat. *Physiol Plant*. 1989;76(4):603-607. doi 10.1111/j.1399-3054.1989.tb05486.x

McHale L., Tan X., Koehl P., Michelmore R.W. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biol.* 2006;7(4):212. doi 10.1186/gb-2006-7-4-212

Middleton A.J., Brown A.M., Davies P.L., Walker V.K. Identification of the ice-binding face of a plant antifreeze protein. *FEBS Lett*. 2009;583(4):815-819. doi 10.1016/j.febslet.2009.01.035

Middleton A.J., Marshal C.B., Faucher F., Bar-Dolev M., Braslavsky I., Campbell R.L., Walker V.K., Davies P.L. Antifreeze protein from freeze-tolerant grass has a beta-roll fold with an irregularly structured ice-binding site. *J Mol Biol*. 2012;416(5):713-724. doi 10.1016/j.jmb.2012.01.032

Monroy A.F., Dryanova A., Malette B., Oren D.H., Ridha Farajalla M., Liu W., Danyluk J., Ubayasena L.W., Kane K., Scoles G.J., Sarhan F., Gulick P.J. Regulatory gene candidates and gene expression analysis of cold acclimation in winter and spring wheat. *Plant Mol Biol.* 2007;64(4):409-423. doi 10.1007/s11103-007-9161-z

Pandey S.P., Somssich I.E. The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiol*. 2009;150(4):1648-1655. doi 10.1104/pp.109.138990

Regand A., Goff H.D. Ice recrystallization inhibition in ice cream as affected by ice structuring proteins from winter wheat grass. *J Dairy Sci*. 2006;89(1):49-57. doi 10.3168/jds.S0022-0302(06)72068-9

Sandve S.R., Rudi H., Asp T., Rognli O.A. Tracking the evolution of a cold stress associated gene family in cold tolerant grasses. *BMC Evol Biol*. 2008;8:245. doi 10.1186/1471-2148-8-245

Sauter M. Phytosulfokine peptide signaling. *J Exp Bot*. 2015;66(17):5161-5169. doi 10.1093/jxb/erv071

Sutka J. Genetic control of frost tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*. 1994;77:277-282. doi 10.1007/BF02262642

Sutka J. Genes for frost resistance in wheat. *Euphytica.* 2001;119:169-177. doi 10.1023/A:1017520720183

Sutka J., Galiba G., Snape J.W. Inheritance of frost resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Acta Agron Hung.* 1997;45:257-263

Talanova V.V., Titov A.F., Topchieva L.V., Malysheva I.E., Venzhik Y.V., Frolova S.A. Expression of genes encoding the WRKY transcription factor and heat shock proteins in wheat plants during cold harden-

ing. *Dokl Biol Sci*. 2008;423:440-442. doi 10.1134/s0012496608060215

Tchagang A.B., Fauteux F., Tulpan D., Pan Y. Bioinformatics identification of new targets for improving low temperature stress tolerance in spring and winter wheat. *BMC Bioinformatics*. 2017;18(1):174. doi 10.1186/s12859-017-1596-x

Tremblay K., Ouellet F., Fournier J., Danyluk J., Sarhan F. Molecular characterization and origin of novel bipartite cold-regulated ice recrystallization inhibition proteins from cereals. *Plant Cell Physiol.* 2005;46(6):884-891. doi 10.1093/pcp/pci093

Urrutia M.E., Duman J.G., Knight C.A. Plant thermal hysteresis proteins. *Biochem Biophys Acta.* 1992;1121(1-2):199-206. doi 10.1016/0167-4838(92)90355-h

Vaitkevičiūte G., Aleliūnas A., Brazauskas G., Armonienė R. Deacclimation and reacclimation processes in winter wheat: novel perspectives from time-series transcriptome analysis. *Front Plant Sci.* 2024;15:1395830. doi 10.3389/fpls.2024.1395830

Vanková R., Kosová K., Dobrev P., Vítámvás P., Trávníčková A., Cvikrová M., Pešek B., Gaudinová A., Přerostová S., Musilová J., Galiba G., Prasil I.T. Dynamics of cold acclimation and complex phytohormone responses in *Triticum monococcum* lines G3116 and DV92 differing in vernalization and frost tolerance level. *Env Exp Bot*. 2014;101:12-25. doi 10.1016/j.envexpbot.2014.01.002

Voets I.K. From ice-binding proteins to bio-inspired antifreeze materials. *Soft Matter.* 2017;13(28):4808-4823. doi 10.1039/c6sm02867e

Wang W., Hao Q., Wang W., Li Q., Wang W. The genetic characteristics in cytology and plant physiology of two wheat (*Triticum aestivum*) near isogenic lines with different freezing tolerances. *Plant Cell Rep*. 2017;36(11):1801-1814. doi 10.1007/s00299-017-2195-z

Wang W., Wang X., Zhang J., Huang M., Cai J., Zhou Q., Dai T., Jiang D. Salicylic acid and cold priming induce late-spring freezing tolerance by maintaining cellular redox homeostasis and protecting photosynthetic apparatus in wheat. *Plant Growth Regul.* 2020;90:109-121. doi 10.1007/s10725-019-00553-8

Wang W., Wang X., Huang M., Cai J., Zhou Q., Dai T., Jiang D. Alleviation of field low-temperature stress in winter wheat by exogenous application of salicylic acid. *J Plant Growth Regul*. 2021;40:811-823. doi 10.1007/s00344-020-10144-x

Wang X., Geng H., Wu D., Wang L., Zhang N., Wang W., Yu D. Isolation of ice structuring proteins from winter wheat in frigid region (Dongnongdongmai1) and the effect on freeze-thaw stability of dough. *Food Res Int.* 2024;197(Pt. 2):115295. doi 10.1016/j.foodres.2024.115295

Willick I.R., Takahashi D., Fowler D.B., Uemura M., Tanino K.K. Tissue-specific changes in apoplastic proteins and cell wall structure during cold acclimation of winter wheat crowns. *J Exp Bot*. 2018;69(5):1221-1234. doi 10.1093/jxb/erx450

Willick I.R., Gusta L.V., Fowler D.B., Tanino K.K. Ice segregation in the crown of winter cereals: evidence for extraorgan and extratissue freezing. *Plant Cell Environ*. 2019;42(2):701-716. doi 10.1111/pce.13454

Winfield M.O., Lu C., Wilson I.D., Coghill J.A., Edwards K.J. Plant responses to cold: transcriptome analysis of wheat. *Plant Biotechnol J*. 2010;8(7):749-771. doi 10.1111/j.1467-7652.2010.00536.x

Wisniewski M., Willick I.R., Duman J.G., Livingston D.P. 3rd, Newton S.S. Plant antifreeze proteins. In: Ramløv H., Friis D. (Eds) Antifreeze Proteins. Vol. 1. Cham: Springer, 2020;189-226. doi 10.1007/978-3-030-41929-5_7

Xue-Xuan X., Hong-Bo S., Yuan-Yuan M., Gang X., Jun-Na S., Dong-Gang G., Cheng-Jiang R. Biotechnological implications from abscisic acid (ABA) roles in cold stress and leaf senescence as an important signal for improving plant sustainable survival under abiotic-stressed conditions. *Crit Rev Biotechnol*. 2010;30(3):222-230. doi 10.3109/07388551.2010.487186

Yang T., Zhang Y., Guo L., Li D., Liu A., Bilal M., Xie C., Yang R., Gu Z., Jiang D., Wang P. Antifreeze polysaccharides from wheat bran: the structural characterization and antifreeze mechanism. *Biomacromolecules*. 2024;25(7):3877-3892. doi 10.1021/acs.biomac.3c00958

Yu X.M., Griffith M., Wiseman S.B. Ethylene induces antifreeze activity in winter rye leaves. *Plant Physiol*. 2001;126(3):1232-1240. doi 10.1104/pp.126.3.1232

Zheng X., Shi M., Wang J., Yang N., Wang K., Xi J., Wu C., Xi T., Zheng J., Zhang J. Isoform sequencing provides insight into freezing response of common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Front Genet*. 2020;11:462. doi 10.3389/fgene.2020.00462

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 13.05.2025. После доработки 15.09.2025. Принята к публикации 24.09.2025.