

Министерство образования и науки РФ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА БОТАНИКИ И ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

Направление: 020400.62 – Биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
Клонирование и экспрессия генов ATG8 *Triticum aestivum*
в условиях засухи

Работа завершена:

Студентка 4 курса

Группа 01 – 204

« » _____ 2016 г. _____ (М.С.Килеева)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель

кандидат биологических наук, научный сотрудник

« » _____ 2016 г. _____ (В.В. Рябовол)

Зав. кафедрой

доктор биологических наук, профессор

« » _____ 2016 г. _____ (О.А. Тимофеева)

Казань – 2016 г.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Типы аутофагии	7
1.2 Молекулярный механизм образования аутофагосом	10
1.3 Роль белка ATG8	14
1.4 Роль аутофагии в жизни растений	16
1.5 Физиологические и биохимические основы влияния засухи на растения	20
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	25
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	25
2.1 Объекты исследования	25
2.2 Клонирование кДНК	25
2.3 Выделение РНК	28
2.4 Проведение ПЦР в реальном времени и анализ экспрессии генов	28
2.5 Приготовление сред	30
2.6 Определение нуклеотидной последовательности ДНК	30
2.7 Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в агарозном геле	31
2.8 Биоинформатический анализ последовательностей	31
2.9 Определение содержания воды в тканях	31
2.10 Определение морфометрических показателей	32
2.11 Определение влагоемкости почвы	32
2.12 Определение содержания H ₂ O ₂	32
2.13 Определение интенсивности ПОЛ	32
2.14 Статистическая обработка	33
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	34
3.1 Молекулярное клонирование и секвенирование генов <i>ATG8</i> <i>Triticum aestivum</i>	34
3.2 Экспрессия генов семейства <i>ATG8</i> в корнях и листьях <i>T. aestivum</i>	40
3.3 Экспрессия генов семейства <i>ATG8</i> <i>T. aestivum</i> в условиях засухи	42

ВЫВОДЫ	49
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	50
Приложение	61

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБК – абсцизовая кислота

АФК – активные формы кислорода

МДА – малоновый диальдегид

ОТ – обратная транскрипция

Пк – паракват

ПКС – программируемая клеточная смерть

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ATG гены – аутофагические гены

ATG белки – аутофагические белки

PE – фосфотидилэтаноламин

PI3K 1 – фосфатидилинозитол – 3 –киназный комплекс 1

ВВЕДЕНИЕ

Аутофагия (от греч. *autos* — «сам», *phagos* — «пожирающий») – это универсальный катаболический процесс деградации внутриклеточного содержимого с помощью специализированных структур – аутофагосом. Этот процесс был описан в 1960-х г.г. сотрудниками Рокфеллеровского университета США на гепатоцитах крысы [Weidberg, 2012]. В настоящее время обнаружено, что аутофагия функционирует у всех эукариот, в том числе у растений. Современные исследования выявили, что аутофагия играет важную роль в ходе роста и развития растительных организмов, включая созревание и прорастание семян, цветение, формирование сосудов [Ghiglione *et al.*, 2008]. Существенную роль аутофагия играет в ответе растительных клеток на действие неблагоприятных факторов среды биотической и абиотической природы, а также в реализации программируемой клеточной смерти (ПКС) [Bassham, 2006].

Засуха, одно из самых распространенных стрессовых воздействий окружающей среды, влияющих на рост и развитие растений [Han, 2011]. Растения разработали различные механизмы стрессовой устойчивости к дефициту воды. Показано, что аутофагия является важным процессом для выживания растения в условиях засухи [Galili, 2011; Liu *et al.*, 2009]. Активация аутофагии, сопровождающаяся многочисленным формированием аутофагосом, в этих условиях является защитной реакцией и направлена на изолирование и удаление окисленных белков и поврежденных органелл, которые образуются вследствие негативного воздействия недостатка воды на клеточный метаболизм [Bassham *et al.*, 2006].

Известно, что для образования аутофагосом необходима активность многочисленных белков АТГ семейства (autophagy-related proteins) [Galili, 2011]. Гомологи АТГ генов найдены у растений, причем многие из них представлены мультигенными семействами. Так, АТГ8, маркерный белок аутофагосом, у арабидопсиса и пшеницы кодируется девятью генами, у риса

и кукурузы – пятью, у сои – одиннадцатью [Chung *et al.*, 2011]. Вопрос необходимости наличия большого генного семейства *ATG8*, кодирующего ключевые белки, участвующие в формировании аутофагосом у растений, до сих пор остается открытым. В настоящее время активно проводятся исследования по изучению экспрессии генов семейства *ATG8* под воздействием таких факторов как засоление, патогенная атака, недостаток углерода и азота, а также при действии фитогормонов. Было обнаружено, что у арабидопсиса при действии различных стрессовых факторов гены *ATG8* экспрессируются дифференциально [Avin-Wittenberg *et al.*, 2011]. В связи с этим, вопрос о том, каким образом происходит изменение активности генов семейства *ATG8* в условиях засухи, представляется актуальным.

Целью настоящей работы являлось обнаружение и анализ активности генов семейства *ATG8* в растениях пшеницы *Triticum aestivum* в условиях засухи.

Были поставлены следующие задачи:

1. провести молекулярное клонирование и секвенирование мРНК генов, кодирующих аутофагические белки семейства *TaATG8*;
2. оценить физиологическое состояние растений (длина листа, содержание воды, H_2O_2 , перекисного окисления липидов) в условиях засухи.
3. провести сравнительный анализ экспрессии генов семейства *TaATG8* в условиях дефицита воды.

ВЫВОДЫ

1. В пшенице *Triticum aestivum* были обнаружены продукты активности генов трех подсемейств *ATG8*. Расшифрованные нуклеотидные последовательности ампликонов кДНК выявленных транскриптов позволили идентифицировать их как *ATG8c*, *ATG8g* и *ATG8h*.
2. Выявлено, что гены трех подсемейств *ATG8* активны как в листьях, так и в корнях проростков пшеницы. Однако, в листьях уровень экспрессии генов *ATG8* в несколько раз выше, чем в корнях.
3. Обнаружено, что в условиях недостатка воды в растениях пшеницы происходят типичные изменения физиологических и биохимических параметров, таких как снижение общего содержания воды, торможение роста листьев, повышение уровня ПОЛ и H_2O_2 , что подтверждает негативное воздействие засухи на растения.
4. Показано, что в условиях засухи в листьях пшеницы происходит дифференциальное повышение уровня экспрессии генов семейства *ATG8*.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Высоцкая, Л.Б.** Гормональная регуляция водного обмена и роста растений на разных фонах минерального питания и при дефиците воды [Текст] / Л.Б. Высоцкая, Д.С. Веселов, Р.Г. Фархутдинов, С.Ю. Веселов // Учебное пособие/ - Уфа: РИЦ БашГУ, 2014. – С. 244.
2. **Горышина, Т.К.** Влияние засоления на растения [Текст] / Т.К. Горышина // Экология растений: учебное пособие для вузов – М.: Издательство «Высшая школа», 1979. – С. 368.
3. **Давлятназарова, З.Б.** Влияние засоления и засухи на про- и антиоксиданты хлоропластов растений картофеля [Текст] / З.Б. Давлятназарова, З.С. Киёмова, Н.Х. Норкулов, С.Х. Ашуров // Физиология растений. – 2013. – Т. 56. – С. 745 – 749.
4. **Дмитриева, С.А.** Эффекты окислительного стресса на ультраструктуру и функциональную активность растительных митохондрий *in vivo* [Текст] / С.А. Дмитриева, А.А. Пономарева, В.В. Рябовол, Ф.В. Минибаева // Биологические мембраны. – 2012. – Т. 29. – С. 267–275.
5. **Ермаков, И.П.** Солевой стресс [Текст] / И.П. Ермаков // Физиология растений: учебник для студ. вузов/ Н.Д. Алехина, Ю.В. Балнокин, В.Ф. Гавриленко; под ред. И.П. Ермакова;– изд. 2-е, испр., - М.: Издательский центр «Академия», 2007. – С. 530 – 533.
6. **Мерзляк М.Н.** Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки [Текст] / М.Н. Мерзляк // Итоги науки и техники. Сер. Физиология растений – 1989. – Т. 6. – С. 168.
7. **Мерзляк, М.Н.** Активированный кислород в жизнедеятельности растений [Текст] / М.Н.Мерзляк // Соросовский Образовательный Журнал, №9. – 1999. – С.20 – 26.
8. **Полесская, О.Г.** Растительная клетка и активные формы кислорода [Текст] / О.Г. Полесская // М.: Университет. Книжный дом, 2007. – С. 139.

9. **Трунова, Т.И.** Растение и низкомолекулярный стресс [Текст] / Т.И. Трунова // 64-е Тимирязевское чтение., - М.: Наука, 2007. – С. 54.
10. **Черезов, С.Н.** Практические работы по водному режиму растений [Текст] / С.Н. Черезов, А.Л. Швалева // Методическая разработка., - Казань: КГУ. – 1992. Т. 300. – С. 50.
11. **Anderson, J.V.** Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in *Euphorbia esula* [Text] / J.V. Anderson, D. G. Davis // *Plant Physiology*. – 2004. – V. 120. – P. 421–433.
12. **Angelovici, R.** Deciphering transcriptional and metabolic networks associated with lysine metabolism during *Arabidopsis* seed development [Text] / R. Angelovici, A. Fait, X. Zhu, J. Szymanski, E. Feldmesser, A.R. Fernieand, G. Galili // *Plant Physiol*. – 2009. – V. 151. – P. 2058–2072.
13. **Bassham, D.** Autophagy in development and stress responses of plants [Text] / D. Bassham, M. Laporte, F. Marty, Y. Moriyasu, Y. Ohsumi, L.J. Olsen, K. Yoshimoto // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2006. – V. 2. – P. 2–11.
14. **Blommaart, E.F.** The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes [Text] / E.F.Blommaart, U. Krause, J.P. Schellens, H. Vreeling-Sindelárová, A.J. Meijer // *Eur. J. Biochem*. – 1997. – V. 243. – P. 240–246.
15. **Bouchereau, A.** Polyamines and environmental challenges: recent development [Text] / A. Bouchereau, A. Aziz, F. Larher, J. Martin-Tanguy // *Plant Science*. – 1999. – V. 140. – P. 103–125.
16. **Chen, Z.** The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement [Text] / Z. Chen, D.R. Gallie // *Plant Cell*. – 2004. – V. 16. – P. 1143–1162.
17. **Chung, T.** See How I Eat My Greens—Autophagy in Plant Cells [Text] / T. Chung // *J. Plant Biol*. – 2011. – V. 54. – P. 339-350.

18. **Close, T.J.** Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins [Text] / T.J. Close // *Physiologia Plantarum*. – 1996. – V. 97. – P. 795–803.
19. **Cuervo, A.M.** Autophagy: many paths to the same end [Text] / A.M. Cuervo // *Mol. Cell. Biochem.* – 2004. – V. 263. – P. 55–72.
20. **Darsow, T.** A multispecificity syntaxin homologue, Vam3p, essential for autophagic and biosynthetic protein transport to the vacuole [Text] / T. Darsow, S.E. Rieder, S.D. Emr // *J. Cell Biol.* – 1997. – V.138. – P. 517–529.
21. **Galili, G.** Degradation of Organelles or Specific Organelle Components via Selective Autophagy in Plant Cells [Text] / G.Galili; S.Michaeli // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2014. – V. 3. – P. 437–442.
22. **Geng, J.** Quantitative analysis of autophagy-related protein stoichiometry by fluorescence microscopy [Text] / J. Geng, M. Baba, U. Nair, D.J. Klionsky // *J. Cell Biol.* – 2008. –V. 182. – P. 129–140.
23. **Ghiglione, H.O.** Autophagy regulated by day length determines the number of fertile florets in wheat [Text] / H.O. Ghiglione, F.G. Gonzalez, R. Serrago, S.B. Maldonado, C. Chilcott, J.A. Curá, D.J. Miralles, T. Zhu, J.J. Casal // *Plant J.*– 2008. V. 55. – P. 1010–1024.
24. **Gutierrez, M.G.** Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells [Text] / M.G. Gutierrez, D.B. Munafo, W. Beron, J. Colombo // *Cell Sci.* – 2004. – V. 117. – P. 2687– 2697.
25. **Han, S.** Role of plant autophagy in stress response [Text] / S.Han, B.Yu, Y. Wang, Y. Liu// *Protein & Cell*. – 2011. – V. 353. – P. 411–416.
26. **Hanaoka, H.** Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an Arabidopsis autophagy gene [Text] / H. Hanaoka, T. Noda, Y. Shirano, T. Kato, H. Hayashi, D. Shibata, S. Tabata, Y. Ohsumi // *Plant Physiol.* – 2002. – V. 129. – P. 1181–1193.
27. **Hawes, M.C.** The role of root border cells in plant defense [Text] / M.C. Hawes, U. Gunawardena, S. Miyasaka, X. Zhao // *Trends in Plant Science*. – 2000. – V. 5. – P. 128–133.

28. **Heath, R.L.** The biochemistry of ozone attack on the plasma membrane of plant cells [Text] / R.L. Heath // *Adv. Phytochem.* – 1987. – V. 21. – P. 29-54.
29. **Hoekstra, F.A.** Mechanisms of plant desiccation tolerance [Text] / F.A. Hoekstra, E.A. Golovina, J. Buitink // *Trends in Plant Science.* – 2001. – V. 6. – P. 431-438.
30. **Hofius, D.** Autophagic components contribute to hypersensitive cell death in *Arabidopsis* [Text] / D. Hofius, T. Schultz-Larsen, J. Joensen, D.I. Tsitsigiannis, N.H. Petersen, O. Mattsson, L.B. Jørgensen, J.D. Jones, J. Mundy, M. Petersen // *Cell.* – 2009. – V. 137. – P. 773–783.
31. **Inoue, Y.** AtATG genes, homologs of yeast autophagy genes, are involved in constitutive autophagy in *Arabidopsis* root tip cells [Text] / Y. Inoue, T. Suzuki, M. Hattori, K. Yoshimoto, Y. Ohsumi, Y. Moriyasu // *Plant Cell Physiol.* – 2006. – V. 47. – P. 1641–1652.
32. **Kabeya, Y.** LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing [Text] / Y. Kabeya, N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E. Kominami, Y. Ohsumi, T. Yoshimori // *EMBO J.* – 2000. – V. 19. – P. 5720–5728.
33. **Kamada, Y.** Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex [Text] / Y. Kamada, T. Funakoshi, T. Shintani, K. Nagano, M. Ohsumi, Y. Ohsumi // *J Cell Biol.* – 2000. – V. 150. – P. 1507–1513.
34. **Kanki, T.** A genomic screen for yeast mutants defective in selective mitochondria autophagy [Text] / T. Kanki, K. Wang, M. Baba, C.R. Bartholomew, M.A. Lynch-Day, Z. Du, J. Geng, K. Mao, Z. Yang, W.L. Yen, D.J. Klionsky // *Mol. Biol. Cell.* – 2009. – V. 20. – P. 4730–4738.
35. **Kihara, A.** Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae* [Text] / A. Kihara, T. Noda, N. Ishihara, Y. Ohsumi // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 152. – P. 519–530.
36. **Kirisako, T.** Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast [Text] / T. Kirisako, M. Baba, N. Ishihara, K. Miyazawa, M. Ohsumi,

- T. Yoshimori, T. Noda, Y Ohsumi // J. Cell Biol. – 1999. – V. 147. – P. 435–446.
37. **Klionsky, D.J.** The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy [Text] / J. Geng, D.J. Klionsky // EMBO reports. – 2008. – V. 9. – P. 859 – 863.
38. **Kraft, C.** Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease [Text] / C. Kraft, A. Deplazes, M. Sohrmann, M. Peter // Nat. Cell Biol. – 2008. – V. 10. – P. 602–610.
39. **Kruger, G.H.J.** Evaluation of components of oxidative stress metabolism for use in selection of drought tolerant cultivars of *Nicotiana tabacum* L [Text] / G.H.J Kruger, L.V. Rensburg // Journal of Plant Physiology. – 1994. – V. 143. – P. 730–737.
40. **Kuzuoglu-Ozturk, D.** Autophagy - related gene, TdAtg8, in wild emmer wheat plays a role in drought and osmotic stress response [Text] / D. Kuzuoglu-Ozturk, O. Cebeci Yalcinkaya, B.A. Akpinar, G. Mitou, G. Korkmaz, D. Gozuacik, H. Budak // Planta. – 2012. – V. 236. – P. 1081–1092.
41. **Legakis, J.E.** A cycling protein complex required for selective autophagy [Text] / J.E. Legakis, W.L. Yen, D.J. Klionsky // Autophagy. – 2007. – V. 3. – P. 422–432.
42. **Levine, B.** Autophagy in immunity and inflammation [Text] / B. Levine, N. Mizushima, H.W. Virgin // Nature. – 2011. – V. 469. – P. 323–335.
43. **Li, L.** Effects of plant growth regulators on the antioxidant system in callus of two maize cultivars subjected to water stress [Text] / L. Li, J. van Staden // Plant Growth Regulation. – 1998. – V. 24. – P. 55–66.
44. **Liu, Y.** TOR is a negative regulator of autophagy in *Arabidopsis thaliana* [Text] / Y. Liu, D.C. Bassham // PLoS One. – 2012. – V. 5. – P. 1188.
45. **Lonbani, M.** Morpho-physiological traits associated with terminal drought stress tolerance in triticale and wheat, Agronomy Research [Text] / M.

- Lonbani, A. Arzani // The Scientific World Journal. – 2011. – V. 9. – P. 315–329.
46. **Manjithaya, R.** Molecular mechanism and physiological role of pexophagy [Text] / R. Manjithaya, T.Y. Nazarko, J.C. Farre, S. Subramani // FEBS Lett. – 2010. – V. 11. – P. 385–396.
47. **Matsunaga, K.** Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages [Text] / K. Matsunaga, T. Saitoh, K. Tabata, H. Omori, T. Satoh, N. Kurotori, I. Maejima, K. Shirahama-Noda, T. Ichimura, T. Isobe, S. Akira, T. Noda, T. Yoshimori // Nat. Cell Biol. – 2009. – V. 6. – P. 257 – 261.
48. **Minibayeva, F.** Oxidative stress-induced autophagy in plants: the role of mitochondria [Text] / F. Minibayeva, S. Dmitrieva, A. Ponomareva, V. Ryabovol // Plant Physiol. Biochem. – 2012. – V. 59. – P. 11–19.
49. **Mizushima, N.** The role of autophagy in quality control inside neural cells [Text] / N. Mizushima // Rinsho Shinkeigaku. – 2006. – V. 46. –P. 885–886.
50. **Møller, I.M.** Oxidative modifications to cellular components in plants [Text] / I.M. Møller, P.E. Jensen, A. Hansson // Annu. Rev. Plant Biol. – 2007. – V. 58. – P. 459–481.
51. **Nakatogawa, H.** Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion [Text] / H. Nakatogawa, Y. Ichimura, Y. Ohsumi // Cell. – 2007. – V. 130. – P. 165–178.
52. **Nesbitt, M.** “From staple crop to extinction? The archaeology and history of the hulled wheats,” in Hulled Wheat: Proceedings of the First International Workshop on Hulled Wheats [Text] / M.Nesbitt, D. Samuel, S. Padulosi, K. Hammer, J. Heller // Plant Genetic [Электронный ресурс]. – 1995. – Режим доступа: http://www.academia.edu/1475235/From_staple_crop_to_extinction_The_archaeology_and_history_of_the_hulled_wheats.
53. **Nezhadahmadi, A.** Drought Tolerance in Wheat [Text] / A. Nezhadahmadi, Z.H. Prodhan, G. Faruq // The Scientific World Journal. – 2013. – V. 14. – P. 11-22.

54. **Obara, K.** Dynamics and function of PtdIns(3)P in autophagy [Text] / K. Obara, Y. Ohsumi // *Autophagy*. – 2008. – V. 4. – P. 952–954.
55. **Paolacci, A.R.** Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat [Text] / A.R. Paolacci, O.A. Tanzarella, E. Porceddu, M. Ciaffi // *BMC Mol. Biol* [Электронный ресурс]. – 2009. – Режим доступа: <http://www.biomedcentral.com/1471-2199/10/11>.
56. **Passioura, J.B.** “Drought and drought tolerance,” in *Drought Tolerance in Higher Plants: Genetical, Physiological and Molecular Biological Analysis* [Text] / J.B. Passioura, E. Belhassen // *The Scientific World Journal*. – 1996. – V. 22. – P. 3–12.
57. **Pei, D.** Identification of autophagy-related genes ATG4 and ATG8 from wheat (*Triticum aestivum* L.) and profiling of their expression patterns responding to biotic and abiotic stresses [Text] / D. Pei, W. Zhang, H. Sun, Xiaojing Wei X. Wei, J. Yue, H. Wang // *Plant Cell Rep.* – 2014. – V. 7. – P. 3–13.
58. **Pfaffl, M.W.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [Text] / M.W. Pfaffl // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – V. 29. – P. 45.
59. **Rana, R.M.** Regulation of ATG6/Beclin-1 homologs by abiotic stresses and hormones in rice (*Oryza sativa* L.) [Text] / R.M. Rana, S. Dong, Z. Ali, J. Huang, H.S. Zhang // *GMR J.* – 2012. – V. 4. – P. 3676–3687.
60. **Rao, R.C.N.** Crop growth, water use efficiency and carbon isotope discrimination in groundnut genotypes under end season drought conditions [Text] / R.C.N. Rao, J.H. Williams, K.D.R. Wadia, K.T. Hubikk, G.D. Fraquhar // *Annals of Applied Biology*. – 1993. – V. 122. – P. 357–367.
61. **Reggiori, F.** The Atg1–Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure [Text] / F. Reggiori, K.A. Tucker, P.E. Stromhaug, D.J. Klionsky // *Dev. Cell*. – 2004. – V. 6. – P. 79–90.
62. **Rizza, F.** Use of a water stress index to identify barley genotypes adapted to rainfed and irrigated conditions [Text] / F. Rizza, F.W. Badeck, L. Cattivelli,

- O. Lidestri, N. di Fonzo, A.M. Stanca // *Crop Science*. – 2004. – V. 44. – P. 2127–2137.
63. **Sanger, F.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors [Text] / F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1977. – V. 74. – P. 5463–5467.
64. **Scandalios, J.G.** Oxygen stress and superoxide dismutases [Text] / J.G. Scandalios // *Plant Physiology*. – 1993. – V. 101. – P. 7–12.
65. **Schansker, G.** Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl a fluorescence rise OJIP [Text] / G. Schansker, S.Z. Tóth, R.J. // *Strasser Biochim. Biophys. Acta*. – 2005. – V. 1706. – P. 250–261.
66. **Scherz-Shouval, R.** Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology [Text] / R. Scherz-Shouval, Z. Elazar // *Trends Biochem. Sci.* - 2010. – V. 36. – P. 30–38.
67. **Shao, H.B.**, Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants [Text] / H.B. Shao, L.Y. Chu, C.A. Jaleel, C.X. Zhao // *The Scientific World Journal*. – 2008. – V. 331. – P. 215–225.
68. **Shi, J. F.** “Gene expression profiles of response to water stress at the jointing stage in wheat,” *Agricultural Sciences in China* [Text] / J. F. Shi, X. G. Mao, R. L. Jing, X. B. Pang, Y. G. Wang, X. P. Chang // *The Scientific World Journal*. – 2010. – V. 9. – P. 325–330.
69. **Shibuya, K.** Pollination induces autophagy in petunia petals via ethylene [Text] / K. Shibuya, T. Niki, K. Ichimura // *J. Exp. Bot.* – 2013. – V. 64. – P. 1111–1120.
70. **Shimazaki, Y.** The root tip and accelerating region suppress elongation of the decelerating region without any effects on cell turgor in primary roots of maize under water stress [Text] / Y. Shimazaki, T. Ookawa, T. Hirasawa // *Plant Physiology*. – 2005. – V. 139. – P. 458–465.

71. **Shin, J.H.** OsATG10b, an autophagosome component, is needed for cell survival against oxidative stresses in rice [Text] / J.H. Shin, K. Yoshimoto, Y. Ohsumi, J.S. Jeon, G. An // *Mol Cells*. – 2009. – V. 27. – P. 67–74.
72. **Singh, T.N.** Stress metabolism. I. Nitrogen metabolism and growth in the barley plant during water stress [Text] / T.N. Singh, L.G. Paleg, D. Aspinall // *Australian Journal of Biological Sciences*. – 1973. – V. 26. – P. 45–56.
73. **Slavikova, S.** The autophagy associated Atg8 gene family operates both under favourable growth conditions and under starvation stresses in Arabidopsis plants [Text] / S. Slavikova, G. Shy, Y. Yao, R. Glozman, H. Levanony, S. Pietrokovski, Z. Elazar, G. Galili // *J. Exp. Bot.* – 2005. – V. 56. – P. 2839–2849.
74. **Slavikova, S.** An autophagy-associated Atg8 protein is involved in the responses of Arabidopsis seedlings to hormonal controls and abiotic stresses [Text] / S. Sláviková, S. Ufaz, T. Avin-Wittenberg, H. Levanony, G. Galili // *J. Exp. Bot.* – 2008. – V. 59. – P. 4029–4043.
75. **Su, W.** Identification and characterization of two rice autophagy associated genes, OsAtg8 and OsAtg4 [Text] / W. Su, H. Ma, C. Liu, J. Wu, J. Yang // *Mol. Biol. Rep.* – 2006. – V. 33. – P. 273–278.
76. **Suzuki, N.** Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction [Text] / N. Suzuki, R. Mittler // *Physiol. Plant.* – 2006. – V. 126. – P. 45–51.
77. **Szegletes, Z.S.** Accumulation of osmoprotectants in wheat cultivars of different drought tolerance [Text] / Z.S. Szegletes, L. Erdei, I. Tari, L. Cseuz // *Cereal Research Communications*. – 2000. – V. 28. – P. 403–410.
78. **Vanhee, C.** Autophagy involvement in responses to abscisic acid by plant cells [Text] / C. Vanhee, H. Batok // *Autophagy*. – 2011. – V. 7. – P. 655–656.
79. **Vierstra, R.D.** Proteolysis in plants: mechanisms and functions [Text] / R.D. Vierstra // *Plant Mol. Biol.* – 2012. – V. 32. – P. 275–302.

80. **Wang, H.** GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton [Text] / H. Wang, F.K. Bedford, N.J. Brandon, S.J. Moss, R.W. Olsen // *Nature*. – 1999. – V. 397. – P. 69–72.
81. **Weidberg H.** LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis [Text] / H. Weidberg, E. Shvets, T. Shpilka, F. Shimron, V. Shinder, Z. Elazar // *EMBO J.* – 2010. – V. 29. – P.1792–1802.
82. **Weidberg, H.** Biogenesis and Cargo Selectivity of Autophagosomes [Text] / H. Weidberg, E. Shvets, Z. Elazar// www.annualreviews.org Autophagosome Biogenesis – 2011. – V. 29. – P. 1792–1802.
83. **Xie, Z.** Autophagosome formation: core machinery and adaptations [Text] / Z. Xie, D.J. Klionsky // *Nat. Cell Biol.* – 2007. – V. 9. – P. 1102–1109.
84. **Xiong, Y.** Disruption of autophagy results in constitutive oxidative stress in Arabidopsis [Text] / Y. Xiong, A.L. Contento, D.C. Bassham // *Autophagy*. – 2007. – V. 3. – P. – P. 257–258.
85. **Yen, W.L.** Atg27 is required for autophagy dependent cycling of Atg9 / W.L. Yen, J.E. Legakis, U. Nair, D.J. Klionsky [Text] // *Mol. Biol. Cell.* – 2006. – V. 18. – P. 581–593.
86. **Yoshimoto, K.** Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in Arabidopsis [Text] / K. Yoshimoto, Y. Jikumaru, Y. Kamiya, M. Kusano, C. Consonni, R. Panstruga, Y. Ohsumi, K. Shirasu // *Plant Cell*. – 2009. – V. 21. – P. 2914–2927.
87. **Yoshimoto, K.** Autophagy in plants and phytopathogens [Text] / K. Yoshimoto, Y. Takano, Y. Sakai // *FEBS Lett.* – 2010. – V. 18. – P. 1–9.
88. **Yu, Z.Q.** Dual roles of Atg8-PE deconjugation by Atg4 in autophagy [Text] / Z.Q. Yu, T. Ni, B. Hong, H.Y. Wang, F.J. Jiang, S. Zou, Y. Chen, X.L. Zheng, D.J. Klionsky, Y. Liang, Z. Xie // *Autophagy*. – 2012. – V. 8. – P. 883–892.

89. **Zhou, J.** Role and regulation of autophagy in heat stress responses of tomato plants [Text] / J. Zhou, J. Wang, J.Q. Yu, Z. Chen // Plant science. – 2014. – V. 5. – P. 1–12.

1. Определение влажности почвы.

Для этого в три бюкса с известной массой добавили почву. Бюксы сушили в течение 6 часов при температуре 100 градусов.

Масса бюкса	Масса с почвой	Масса почвы	Масса бюкса с почвой после сушки	Убыль в массе	Кол-во воды в %
22,6445	27,714	5,0695	26,6462	1,0678	21
22,4617	27,4789	5,0172	26,1117	1,3672	27
22,9060	27,9119	5,0059	26,5815	1,3304	26
		5,031		1,255	24,9

Количество воды определили в % к массе почвы:

Масса почвы – убыль в массе

100 г - x%

2. Определение влагоемкости почвы.

Цинковые цилиндры с сетчатым дном взвесили и заполнили почвой. После чего поставили в сосуд с водой до полного всасывания воды почвой

Масса цилиндра	Масса цилиндра с почвой	Масса почвы	Масса с почвой, насосавшей воду	Прибыль в массе. Количество поглощенной воды	Количество поглощенной воды в %
220,583	252,108	31,52	315,729	63,6213	
			315,73		
			315,729		
Среднее значение			315,7293		201,8

Масса почвы = массе цилиндра с почвой - масса цилиндра

Количество поглощенной воды определяют в % к массе взятой почвы:

Масса почвы – 100%

Прибыль в массе – x%

3. Определение полной влагоемкости почвы:

Равняется проценту воды, содержащейся в почве + проценту воды, поглощенной почвой:

$$24,9\% + 201,8\% = 226,7\%$$

Общую полную влагоемкость рассчитывают на абсолютно сухую почву.

$$100\text{г} - 24,9\text{г} = 75,1\text{г}$$

Определили влагоемкость 100г абсолютно сухой почвы:

$$75,1 - 226,7$$

$$100\text{г} - x$$

$$X = 301,86\text{г}$$