

Влияние криопротекторов на флуоресценцию меристем картофеля

UDC 547.42:577.336: 581.817-295.14

YU.S. LYSAK*, T.F. STRIBUL, A.M. KOMPANIETS

Cryoprotectant Influence on Fluorescence of Potato Meristems

Исследована зависимость флуоресцентного свечения клеток меристем картофеля от воздействия на меристемы веществ с криопротекторными свойствами. Обработанные криопротекторами меристемы облучали лазером, возбуждали флуоресценцию и через 1, 3, 5, 120 мин регистрировали спектры флуоресценции. Установлено, что влияние криозащитных веществ проявлялось в изменении интенсивности свечения в диапазоне исследованных длин волн.

Ключевые слова: флуоресценция, свободнорадикальные реакции, антиоксиданты, пероксидазное окисление, хлорофилл, меристема.

Досліджена залежність флуоресцентного світіння клітин меристем картоплі від впливу на меристеми речовин з криопротекторними властивостями. Меристеми, оброблені криопротекторами, опромінювали лазером, збуджували флуоресценцію і через 1, 3, 5, 120 хв реєстрували спектри флуоресценції. Встановлено, що вплив криозахисних речовин виявлявся у зміні інтенсивності світіння у діапазоні досліджених довжин хвиль.

Ключові слова: флуоресценція, вільнорадикальні реакції, антиоксиданти, пероксидазне окислення, хлорофіл, меристема.

We have investigated the dependence of potato meristems fluorescence on effect of the agents with cryoprotective properties on meristems. Meristems treated with cryoprotectant were irradiated with laser, fluorescence was excited and in 1, 3, 5, 120 min the fluorescence spectra were recorded. We have found that the effect of cryoprotective agents was manifested in the fluorescence intensity change within investigated wave length range.

Key words: fluorescence, free-radical reactions, antioxidants, peroxidase oxidation, chlorophyll, meristem.

Для сохранности меристем растений в процессе низкотемпературного консервирования применяются криозащитные вещества различной природы.

Криопротекторы, помимо защитного, могут оказывать и токсическое действие на клетки меристем, являющееся стрессовым фактором. В результате стресса, вызванного действием любого химического вещества на живую клетку, нарушается липидный бислой мембран, изменяется активность ферментных комплексов, что в конечном счете влияет на структурно-функциональное состояние мембран клеток и органелл, обладающих окислительно-восстановительной функцией [1, 7]. В результате таких изменений ускоряются свободнорадикальные процессы, приводящие к появлению флуоресцирующих продуктов перекисного окисления [4, 6, 17].

Одним из информативных методов исследования интенсивности протекания окислительных процессов в клетках растений и состояния фотосинтетического аппарата является флуоресцентная микроскопия [2, 5, 9].

В работах [14, 16, 19] экспериментально показано, что стрессовые факторы (токсические агенты, гиперосмотические концентрации солей) интенсифицируют процессы перекисного окисления в растительных тканях и увеличивают количество

To preserve plant meristems during low-temperature storage the cryoprotective agents of different origin are applied.

Together with protective effect the cryoprotectants may affect toxically the meristem cells, causing a stress. The stress caused by influence of any chemical substance on living cell results in the membrane lipid bilayer disorders, as well as in the changes in the activity of enzyme complexes, that finally affects the structure-functional state of the cell and organelle membranes performing redox function [1, 7]. Such changes result in acceleration of free-radical processes leading to the appearance of fluorescent products of peroxidation [4, 6, 17].

The fluorescent microscopy is one of the informative methods for investigation of the oxidative processes course intensity in plant cells and the state of photosynthetic apparatus [2, 5, 9].

It has been experimentally shown [14, 16, 19] that stress factors (toxic agents, hyperosmotic salt concentrations) intensify the peroxidation processes in plant tissues and increase the number of excited electrons in chloroplasts, that results in the rising of fluorescence intensity if compared to the intact control. After termination of stress factor influence on plant cells the curve of cell fluorescence intensity returns to the control level but only if the effect was moderate [12].

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-30-07, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта:
cryo@online.kharkov.ua

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3007, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

возбужденных состояний электронов в хлоропластах, в результате чего интенсивность флюоресценции возрастает по сравнению с интактным контролем. После прекращения действия стрессового фактора на растительные клетки кривая интенсивности свечения клеток возвращается к уровню контроля, но только при условии его умеренного влияния [12].

Исследования действия криопротекторов на окислительно-восстановительные процессы в меристемах растений, проведенные на основе флюоресцентно-микроскопического анализа, актуальны, поскольку в литературе отсутствуют данные относительно указанной проблемы. В предыдущей работе [10] с помощью метода лазерной конфокальной флюоресцентной микроскопии мы изучали влияние криопротекторов и их смесей на изменение флюоресценции клеток меристем винограда.

Цель данной работы – исследование действия проникающих и непроникающих криопротекторов, а также их комбинаций на изменение флюоресценции клеток меристем картофеля, а также на их жизнеспособность.

Материалы и методы

Исследовали меристемы картофеля *Solanum tuberosum*. После выделения из *in vitro* выращенных растений меристемы культивировали в течение 24 ч на среде Мурасиге-Скуга (Murashige, Skoog, 1962) с половинным составом солей (1/2 MS).

Исследовали следующие растворы: 1 М 1,2-пропандиола (1,2-ПД) на среде 1/2 MS; 7% поливинилпирролидона (ПВП) с молекулярной массой 24000 на среде 1/2 MS; 0,75 М NaCl на дистиллированной воде.

Флюоресценцию клеток меристем картофеля изучали с помощью конфокального микроскопа LSM-510 META ("Carl Zeiss", Германия). Использовали диодный лазер с длиной волны 405 нм и рабочей мощностью 180 мВт. Размер лазерной апертуры (*pin hole*) – 228 мкм. Спектры флюоресценции получали из лямбда-серий (*lambda stacks*) в диапазоне 411–754 нм с шагом 11 нм с помощью приложения Zeiss LSM Image Examiner ("Carl Zeiss", Германия).

Группу меристем в каплях среды 1/2 MS помещали под микроскоп, возбуждали флюоресценцию и фиксировали эмиссию [13]. Спектр свечения, соответствующий этому процессу, обозначили "контроль" (F_0) (рис. 1). Спектры флюоресценции контрольных образцов имели два максимума в области 530 и 680 нм. Затем меристемы обрабатывали одним из растворов криопротекторов. Для этого их переносили из среды 1/2 MS в раствор криопротектора и через 1, 3, 5, 20 и 120 мин регистрировали спектры флюоресценции (F). Полученные спектры нормировали на соответствующие им

The investigations of cryoprotectant influence on redox processes in plant meristems performed on the background of fluorescent-microscopic analysis are essential, as there are no data on this problem in the literature. In the recent research [10] we studied the influence of cryoprotectants and their mixtures on the fluorescence change of grape meristem cells using laser confocal fluorescent microscopy.

The research aim was to investigate the effect of penetrating and non-penetrating cryoprotectants as well as their combinations on the changes in potato meristem cell fluorescence, as well as on their survival.

Materials and methods

The meristems of potato *Solanum tuberosum* were investigated. After isolation from grown *in vitro* plants the meristems were cultured during 24 hrs in Murashige-Skoog medium (Murashige, Skoog, 1962) with half content of salts (1/2 MS).

The following solutions were investigated: 1 M solution of 1,2 propane diol (1,2-PD) in 1/2 MS medium; 7% solution of polyvinyl pyrrolidone (PVP) with molecular mass of 24000 in 1/2 MS medium; 0.75 M NaCl solution in distilled water.

The fluorescence of potato meristem cells was investigated with the confocal microscope LSM-510 META (Carl Zeiss, Germany). We used the diode laser with 405 nm wave length and 180 mW operating power. The pin hole was 228 μm . The fluorescence spectra were acquired from lambda stacks within 411–754 nm wave length range with 11 nm bandwidth using Zeiss LSM Image Examiner software (Carl Zeiss, Germany).

The group of meristems in drops of 1/2 MS medium was placed in microscope, fluorescence was excited and emission was recorded [13]. Fluorescence spectrum corresponding to this process was denoted as the 'control' (F_0) (Fig. 1). The fluorescence spectra of the control samples had two maxima around 530 and 680 nm. Later the meristems were treated with one of cryoprotectant solutions. They were transferred from 1/2 MS medium into cryoprotectant solution and in 1, 3, 5, 20 and 120 min the fluorescence spectra (F) were recorded. Acquired spectra were normalized by corresponding control spectra (F/F_0). At the same time the meristems were incubated in investigated cryoprotectant solutions, upon the expiration of set time the cryoprotectants were removed out of incubation medium by double change of 1/2 MS medium during 60 min, afterwards the meristems were placed into phytotron for further culturing. To determine the survival in the 4th day we calculated the ratio between number of living meristems (that preserved the green color and tended to grow during the observation period) and total amount of meristems.

In each experimental series 5–7 meristems were used. The results were statistically processed using the software Statistica 6.0 and method of the least signifi-

контрольные спектры (F/F_0). Параллельно меристемы инкубировали в исследуемых растворах криопротекторов, по истечении установленного времени криопротекторы удаляли из инкубационной среды посредством двукратной смены 1/2 MS среды в течение 60 мин, затем меристемы помещали в фитотрон для дальнейшего культивирования. Для определения сохранности на 4-е сутки подсчитывали отношение количества живых меристем (тех, которые сохраняли зеленый цвет и проявляли тенденцию к росту в течение всего времени наблюдения) к их общему количеству.

В каждой серии эксперимента использовали 5–7 меристем. Результаты статистически обрабатывали с использованием программы статистического анализа Statistica 6.0 и метода наименьшей существенной разницы. Для оценки достоверности различий экспериментальных данных применяли критерий Фишера.

Результаты и обсуждение

В спектре флюоресценции исходных меристем на фоне свечения слабой интенсивности на всем исследуемом интервале длин волн наблюдается два максимума в областях 500–540 и 670–690 нм (рис. 1). В интервале длин волн 450–650 нм свечение обусловлено процессами перекисного окисления липидов мембран и фенольных соединений, выходящих из клеток, а в области 650–750 нм – процессами возбуждения электронов в структуре хлоропластов [3, 8, 12].

В данной работе исследовали действие растворов электролитов и неэлектролитов. В качестве электролита был выбран гиперконцентрированный раствор NaCl [12, 15].

Как видно из рис. 2, при выдержке меристем картофеля в растворе 0,75 М NaCl флюоресцентное свечение уменьшалось практически равномерно на всех длинах волн, т. е. действие раствора NaCl в течение 20 мин вызывало угнетение окислительных процессов в клетках меристем.

На меристемы картофеля раствор 0,75 М NaCl оказывал выраженное повреждающее действие. На 2-е и 3-и сутки культивирования меристемы, обработанные раствором NaCl, визуально не отличались от контрольных, а на 4-е сутки у них определялись видимые признаки некроза. Таким образом, в данном опыте сохранность меристем картофеля составляла 0% при 100%-й выживаемости в контроле.

Меристемы винограда оказались более уязвимыми к действию раствора 0,75 М NaCl: гибель обработанных образцов происходила непосредственно в день проведения эксперимента.

На следующем этапе изучали влияние низкомолекулярного проникающего криопротектора 1,2-ПД на флюоресценцию меристем картофеля [18].

difference. To assess the statistical significance of differences of experimental data the Fisher's criterion was applied.

Results and discussion

In the fluorescence spectrum of non-treated meristems we observed two maxima within the 500–540 and 670–690 nm range on the background of weak fluorescence along the whole investigated interval of wave lengths (Fig. 1). In the 450–650 nm wave length range the fluorescence is stipulated by the peroxidation of membrane lipids and phenol compounds released from the cells, and in the 650–750 nm region it results from the electron excitation processes in chloroplast structure [3, 8, 12].

In this work we investigated the effect of electrolytes and non-electrolytes. Hyperconcentrated NaCl solution was chosen as an electrolyte [12, 15].

Fig. 2 shows that during exposure of potato meristems in 0.75 M NaCl solution the fluorescence decreased almost uniformly in the whole investigated range of wave lengths, *i. e.* 20 min influence of NaCl solution caused the suppression of oxidative processes in meristem cells.

NaCl solution caused an expressed damaging effect on the potato meristems. In the 2nd and the 3rd days of culturing the meristems treated by NaCl solution visually did not differ from the control ones, but in the 4th day they had visible signs of necrosis. Thus in this experiment the potato meristem survival made 0% unlike 100% survival in the non-treated control.

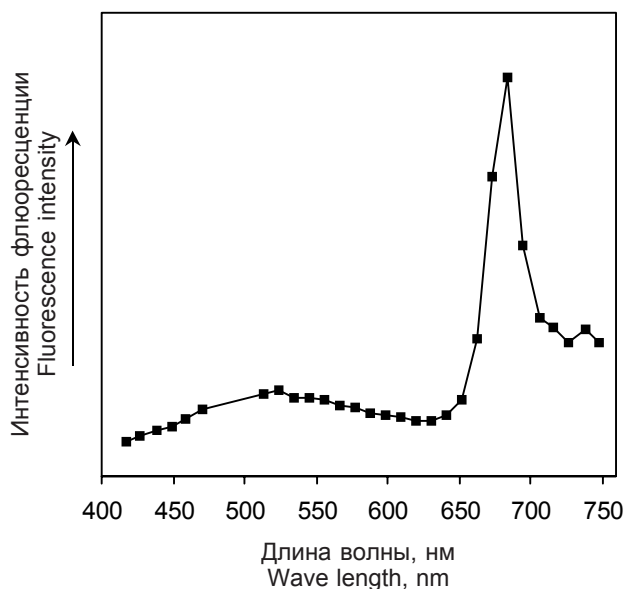


Рис. 1. Спектр флюоресценции меристем картофеля в среде 1/2 MS при возбуждении лазером с длиной волны 405 нм.

Fig. 1. Spectrum of potato meristem fluorescence in 1/2 MS medium under 405 nm wave length laser excitation.

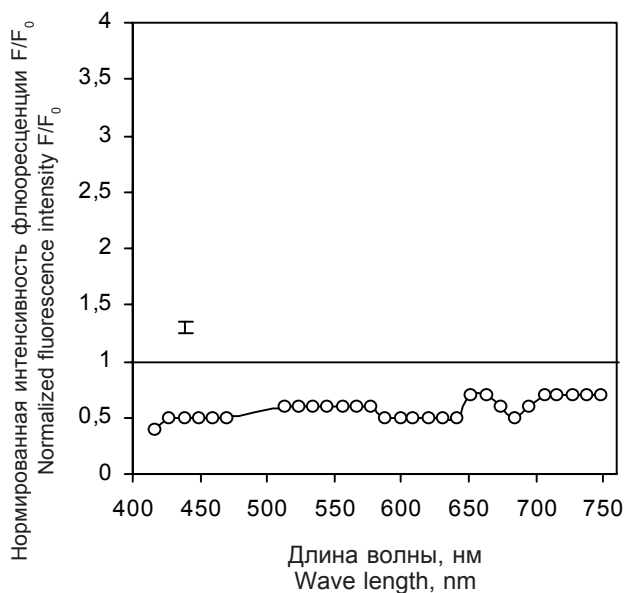


Рис. 2. Нормированный спектр флюоресценции меристем картофеля при возбуждении лазером с длиной волны 405 нм через 20 мин после действия 0,75 М NaCl.

Fig. 2. Normalized spectrum of potato meristem fluorescence under 405 nm wave length laser excitation in 20 min after adding of 0.75 M NaCl

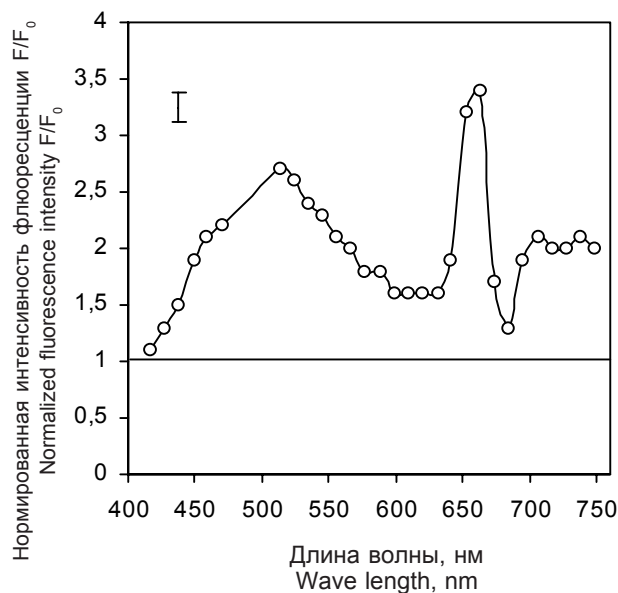


Рис. 3. Нормированный спектр флюоресценции меристем картофеля при возбуждении лазером с длиной волны 405 нм через 20 мин после действия 1 М 1,2-ПД.

Fig. 3. Normalized spectrum of potato meristem fluorescence under 405 nm wave length laser excitation in 20 min after adding of 1 M 1,2-PD.

Во всем диапазоне исследованных длин волн у меристем картофеля, обработанных раствором 1М 1,2-ПД, наблюдалось усиление флюоресцентного свечения, особенно в областях 500–530 и 660–670 нм (рис. 3). Так, через 20 мин после действия раствора 1 М 1,2-ПД интенсивность флюоресценции значительно превышала контроль. При дальнейшем наблюдении была выявлена тенденция к постепенному снижению интенсивности свечения. Все это может свидетельствовать о том, что данный стрессовый фактор не превышает компенсаторные возможности ткани меристемы и не приводит к ее гибели. Сохранность меристем картофеля в данном опыте составила $70 \pm 10\%$. Необходимо отметить, что спектральные изменения флюоресценции меристем картофеля в присутствии 1 М 1,2-ПД аналогичны тем, которые наблюдались нами ранее в спектрах флюоресценции меристем винограда под влиянием данного криопротектора [10, 11].

Реакция меристем картофеля на действие непроникающего в клетки растений 7%-го раствора ПВП противоположна реакции на действие раствора 1 М 1,2-ПД (рис. 3 и 4). Так, через 1 ч контакта меристем с ПВП наблюдали снижение интенсивности флюоресценции почти вдвое по отношению к интенсивности свечения исходных меристем, 2-часовая экспозиция с ПВП вызывала еще большее снижение интенсивности свечения.

Поскольку интенсивность флюоресценции меристем, обработанных ПВП, со временем стано-

ва Grape meristems were more sensitive to the damaging effect of 0.75 M NaCl solution: the death of treated samples occurred just in the day of experiment.

At the following stage we investigated the influence of low-molecular penetrating cryoprotectant 1,2-PD on the potato meristem fluorescence [18].

In the whole range of investigated wave lengths in potato meristems treated by 1 M 1,2-PD solution we observed the strengthening of fluorescence especially within 500–530 and 660–670 nm range (Fig.3). So, in 20 min after treatment with 1 M 1,2-PD the fluorescence intensity was significantly higher than the control. During further observation the tendency to gradual lowering in fluorescence intensity was noted. All these observations may testify to the fact that this stress factor does not exceed the tissue compensatory abilities and does not lead to its death. Potato meristem integrity was $70 \pm 10\%$ in this experiment. It is worth to note that spectral changes of potato meristem fluorescence in presence of 1 M 1,2-PD are similar to the ones observed earlier in grape meristem fluorescence spectra under the influence of this cryoprotectant [10, 11].

The reaction of potato meristems for the effect of 7% PVP solution, non-penetrating into plant cells, is opposite to the reaction for the effect of 1M 1,2-PD solution (Fig. 3 and 4). So after 1 hour exposure of meristems to PVP solution we observed the lowering of fluorescence intensity almost half as much comparing to the fluorescence intensity of non-treated meristems, 2 hour exposure to PVP caused greater lowering in fluorescence intensity.

Рис. 4. Нормированный спектр флюоресценции меристем картофеля при возбуждении лазером с длиной волны 405 нм после действия 7%-го раствора ПВП: 1 – через 1 ч; 2 – через 2 ч.

Fig. 4. Normalized spectra of potato meristem fluorescence under 405 nm wave length laser excitation after adding of 7% PVP solution: 1 – in one hour; 2 – in 2 hrs.

вится слабее по отношению к интенсивности свечения контрольных меристем, то можно предположить, что стресс, вызванный действием ПВП на клетки, приведет к необратимым изменениям в них и даже гибели. Данные по сохранности меристем картофеля подтверждают это предположение: после 2-часового действия 7%-го раствора ПВП этот показатель был равен нулю.

В отличие от картофеля, окислительные процессы в клетках меристем винограда, в том числе в хлоропластах, вызванные действием 7%-го раствора ПВП, имели обратимый характер и не вызвали гибели клеток. Об этом свидетельствуют полученные показатели сохранности меристем винограда, которые приближались к $50 \pm 10\%$ [10].

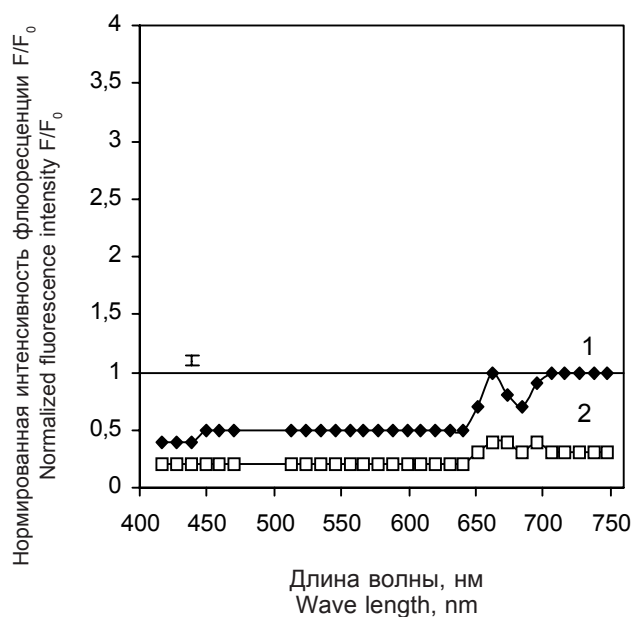
Выводы

Таким образом, действие раствора 1 М проникающего криопротектора 1,2-ПД можно рассматривать как стресс-фактор умеренной интенсивности по отношению к меристемам картофеля, после действия которого они сохраняют свою жизнеспособность. Об обратимости окислительных процессов свидетельствует динамика изменения интенсивности флюоресценции меристем до и после действия криопротектора: интенсивность флюоресценции в опытных образцах после увеличения имела тенденцию приближаться к уровню контроля. Этот факт подтверждает перспективность использования данного криопротектора при разработке методов низкотемпературного консервирования меристем картофеля.

Растворы 7% ПВП и 0,75 М NaCl, напротив, оказывали повреждающее действие и приводили к гибели клеток меристем картофеля. Интенсивность свечения обработанных в течение 1 ч раствором ПВП меристем была ниже, чем у контрольных образцов, и в дальнейшем продолжала снижаться.

Литература

1. Барабой В.А., Брехман И.И., Голотин В.Г., Кудряшов Ю.Б. Перекисное окисление и стресс.– СПб: Наука, 1992.– 148 с.
2. Брайон А.В. Распознавание целых и поврежденных клеток при флуоресцентно-микроскопическом анализе растительных тканей // Вісник КДУ. Сер. "Біологія".– 1967.– №9.– С. 125–127.



Since the fluorescence intensity of PVP treated meristems decreases comparing to the control fluorescence intensity when increasing the time of exposure, it is possible to suggest that stress caused by PVP effect on cells, would lead to non-reversible changes in the cells, even death. The data on potato meristem survival confirm this suggestion: after 2 hour exposure in 7% PVP solution this index was equal to zero.

The oxidative processes in grape cell meristems as well as in chloroplasts caused by effect of 7% PVP solution had a reversible character and did not cause the cells death unlike the observation in potato meristems. Obtained indices of grape meristem survival integrity approaching $50 \pm 10\%$ testify to this fact [10].

Conclusions

Thus the action of 1 M solution of penetrating 1,2-PD may be considered as a stress factor of moderate intensity in relation to potato meristems after effect of which they remain viable. The dynamics of changes in meristem fluorescence intensity prior to and after cryoprotectant effect testifies about the reversibility of oxidative processes: fluorescence intensity in experimental samples increased and thereafter tended to approach the control level. This fact confirms the potential application of this cryoprotectant when developing the methods of potato meristem low-temperature preservation.

And *vice versa*, the solutions of 7% PVP and 0.75 M NaCl revealed a damaging effect and led to the death of potato meristem cells. Fluorescence intensity of meristems after 1 hr treatment with PVP solution was lower than in the control samples and continued to decrease thereafter.

3. *Владимиров Ю.А.* Свечение, сопровождающее биохимические реакции // Соросовский образовательный журнал.– 1999.– №6.– С. 25–32.
4. *Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И. и др.* Свободные радикалы в живых системах // Итоги науки и техники ВИНТИ. Сер. “Биофизика”.– 1991.– Т. 29.– 252 с.
5. *Карнаухов В.Н.* Люминесцентный анализ клеток.– Пущино, 2002.– 131 с.
6. *Мерзляк М.Н.* Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки // Итоги науки и техники ВИНТИ. Сер. “Физиология растений”.– 1989.– Т. 6.– 167 с.
7. *Нардид О.А.* Исследование влияния низкомолекулярных криопротекторов на дыхательную цепь митохондрий методом ЭПР спинового зонда // Проблемы криобиологии.– 2009.– Т.19, №2.– С. 177–185.
8. *Петрова Л.Н., Ерошенко Ф.В.* Структурная организация фотосинтетического аппарата и качество зерна озимой пшеницы // Научный журнал КубГАУ.– 2006.– №24.– С. 5–6.
9. *Рощина В.В., Мельникова Е.В., Карнаухов В.Н.* Флуоресцирующий мир растительных клеток // Наука в России.– 2000.– №6.– С. 53–56.
10. *Стрибуль Т.Ф., Лысак Ю.С., Компаниец А.М.* Изменение интенсивности флуоресценции клеток меристемной ткани винограда под действием ряда криопротекторов // Проблемы криобиологии.– 2010.– Т. 20, №3.– С. 297–302.
11. *Стрибуль Т.Ф., Лысак Ю.С., Присталов А.И., Коваленко И.Ф.* Исследование динамики насыщения меристем винограда криозащитными средами // Биофизика живой клетки.– 2008.– Т. 9.– С. 125.
12. *Тарусов Б.Н., Веселовский В.А.* Сверхслабые свечения растений и их прикладное значение.– М.: Изд-во Моск. ун-та, 1978.– 151 с.
13. *Феофанов А.В.* Спектральная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия в биологических исследованиях // Успехи биологической химии.– 2007.– Т. 47.– С. 371–410.
14. *Цей А.А., Веселовский В.А., Тарусов Б.Н.* Действие некоторых токсических агентов на сверхслабое свечение растений // Сверхслабые свечения в биологии: Сб. научных трудов.– М.: Наука, 1972.– Т. 39.– 250 с.
15. *Цой К.М., Веселовский В.А., Тарусов Б.Н.* Сверхслабая хемилюминесценция растительных тканей при действии осмотических концентраций различных солей // ДАН СССР.– 1967.– Т. 176, №4.– С. 131–139.
16. *Шевченко И.В., Погосян С.И., Мерзляк М.Н.* Перекисное окисление мембранных липидов при действии на растения галоид-феноксикислот // Физиология растений.– 1980.– Т. 27, №2.– С. 363–369.
17. *Apel K., Hirt H.* Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction // Annu. Rev. Plant Biol.– 2004.– Vol. 55.– P. 373–399.
18. *Diaz E., Sad M.E., Iglesia E.* Homogeneous oxidation reactions of propanediols at low temperatures // Chem. Sus. Chem.– 2010.– Vol. 3, N9.– P. 1063–1070.
19. *Jefferies R.A.* Effects of drought on chlorophyll fluorescence in potato (*Solanum tuberosum* L.). I. Plant water status and the kinetics of chlorophyll fluorescence // Potato Research.– 1992.– Vol. 35, N1.– P. 25–34.

*Поступила 02.11.2010
Рецензент Т.С. Дюбко*

References

1. *Baraboy V.A., Brekhman I.I., Golotin V.G., Kudryashov Yu.B.* Peroxidation and stress.– St.-Petersburg: Nauka, 1992.– 148 p.
2. *Brayon A.V.* Identification of undamaged and damaged cells in fluorescent microscopy analysis of plant tissues // Visnyk of Kiev State University. Series Biology.– 1967.– N9.– P. 125–127.
3. *Vladimirov Yu.A.* Fluorescence accompanying biochemical reactions // Soros Educational Journal.– 1999.– N6.– P. 25–32.
4. *Vladimirov Yu.A., Azizova O.A., Deyev A.I. et al.* Free radicals in living systems // Itogi Nauki i Tekhniki VINITI. Series Biophysics.– 1991.– Vol. 29.– 252 p.
5. *Karnaukhov V.N.* Luminescent analysis of cells.– Puschino, 2002.– 131 p.
6. *Merzlyak M.N.* Activated oxygen and oxidative processes in membranes of plant cells // Itogi Nauki i Tekhniki VINITI. Series Physiology of Plants.– 1989.– Vol. 6.– 167 p.
7. *Nardid O.A.* Study of low-molecular effect of cryoprotectants on mitochondria respiratory chain by spin probe EPR // Problems of Cryobiology.– 2009.– Vol.19, N2.– P. 177–185.
8. *Petrova L.N., Yeroshenko F.V.* Structural organization of photosynthetic apparatus and quality of fall wheat grain // Scientific Journal of Kuban State Agrarian University.– 2006.– N24(8).– P. 4–5.
9. *Roschina V.V., Melnikova Ye.V., Karnaukhov V.N.* Fluorescent world of plant cells // Nauka v Rossii.– 2000.– N6.– P. 53–56.
10. *Stribul T.F., Lysak Yu.S., Kompaniets A.M.* Change in fluorescence intensity of grape meristem cells under effect of some cryoprotective agents // Problems of Cryobiology.– 2010.– Vol. 20, N3.– P. 297–302.
11. *Stribul T.F., Lysak Yu.S., Pristalov A.I., Kovalenko I.F.* Investigation of dynamics of grape meristem saturation with cryoprotective media // Biofizika Zhivoy Kletki.– 2008.– Vol. 9.– P. 125.
12. *Tarusov B.N., Veselovskiy V.A.* Ultra-low plants fluorescence and their applied value.– Moscow: Moscow State University, 1978.– 151 p.
13. *Feofanov A.V.* Spectral laser scanning confocal microscopy in biological studies // Uspekhi Biologicheskoy Khimii.– 2007.– Vol. 47.– P. 371–410.
14. *Tsey A.A., Veselovskiy V.A., Tarusov B.N.* Effect of some toxic agents on ultra-low fluorescence in plants // Ultra-low fluorescence in biology.– Moscow: Nauka, 1974.– Vol. 50.– P. 77–85.
15. *Tsoy K.M., Veselovskiy V.A., Tarusov B.N.* Ultra-low hemiluminiscence of plant tissues under influence of osmotic concentrations of different salts // Doklady Akademii Nauk SSSR.– 1967.– Vol. 176, N4.– P. 131–139.
16. *Shevchenko I.V., Pogosyan S.I., Merzlyak M.N.* Peroxidation of membrane lipids under influence of haloid-phenoxy acids // Fiziologiya Rasteniy.– 1980.– Vol. 27, N2.– P. 363–369.
17. *Apel K., Hirt H.* Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction // Annu. Rev. Plant Biol.– 2004.– Vol. 55.– P. 373–399.
18. *Diaz E., Sad M.E., Iglesia E.* Homogeneous oxidation reactions of propanediols at low temperatures // Chem. Sus. Chem.– 2010.– Vol. 3, N9.– P. 1063–1070.
19. *Jefferies R.A.* Effects of drought on chlorophyll fluorescence in potato (*Solanum tuberosum* L.). I. Plant water status and the kinetics of chlorophyll fluorescence // Potato Research.– 1992.– Vol. 35, N1.– P. 25–34.

Accepted in 02.11.2010