

Нуклеирующие агенты грибов и растений**Nucleating Agents of Fungi and Plants**

В обзор включены современные представления о структуре и активности нуклеирующих агентов грибов и растений. Дано сравнительное описание нуклеаторов у представителей царств Растения и Грибы и нуклеаторов бактериального происхождения.

Ключевые слова: белки-нуклеаторы, устойчивость к заморзанию, лишайники, грибы, растения.

В обзорі наведені сучасні уявлення про структуру та активність нуклеуючих агентів грибів і рослин. Подано порівняльний опис нуклеаторів у представників царств Рослини та Гриби та нуклеаторів бактеріального походження.

Ключові слова: білки-нуклеатори, стійкість до замерзання, лишайники, гриби, рослини.

The modern ideas of fungus and plant nucleating agents' structure and activity are presented in the review. The data on nucleators in representatives of the Kingdoms Plants and Fungi are compared with those on nucleators of bacterial origin.

Key words: nucleating proteins, freezing-tolerance, lichens, fungi, plants.

В природе биологические нуклеирующие агенты (НА), которые действуют как катализаторы кристаллизации при температуре выше -10°C , широко распространены. Наиболее полно в этом аспекте изучены нуклеирующие бактерии [10, 13, 32, 33], а также белки-нуклеаторы (БН) животных [1, 7, 11, 25, 30, 31, 34, 37]. В настоящей работе принята попытка обобщить данные о НА грибов и растений.

Нуклеаторы царства Грибы

Из 40 исследованных видов грибов способностью к нуклеации льда обладают только *Fusarium acuminatum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium tritinctum* и *Fusarium avenaceum* [24, 26]. Для видов *Fusarium* характерна нуклеирующая активность, которая не зависит от ареала и растения-хозяина. Нуклеирующие агенты *Fusarium* практически не чувствительны к изменениям pH, в отличие от бактериальных НА, активность которых резко уменьшается при pH ниже 6 и выше 9. Часть НА *Fusarium* не связана с клетками, поскольку после фильтрации, при которой клетки *Fusarium* полностью удаляются, нуклеирующая активность фильтрата снижается лишь частично.

F. acuminatum и *F. avenaceum* – широко распространенные фитопатогены, вызывающие корневую гниль. Эти грибы легко инфицируют корни растений, поврежденные в результате заморозков [27]. Поскольку даже макроконидии обоих видов *Fusarium* активны в отношении нуклеации льда [26], нуклеирующие споры могут способствовать воз-

Biological ice nucleating agents (INAs), acting as crystallization catalysts above -10°C are widely spread in nature. Nucleating bacteria are studied most completely in this aspect [10, 13, 32, 33], as well as animal ice nucleating proteins (INPs) [1, 7, 11, 25, 30, 31, 34, 37]. The presented research attempted to summarize the data about INAs of fungi and plants.

Nucleating agents of Kingdom Fungi

Among fourty investigated species of fungi only *Fusarium acuminatum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium tritinctum* and *Fusarium avenaceum* [24, 26] have ability to ice nucleation. *Fusarium* species possess nucleating activity, which is independent on habitat area or host-plant. Nucleating agents of *Fusarium* are almost not sensitive to pH changes unlike bacterial INAs, which activity sharply decreases when pH is below 6 and above 9. A part of *Fusarium* INAs is not bound with cells, since the filtration, removing the *Fusarium* cells, lead only to partial loss of filtrate nucleating activity.

F. acuminatum and *F. avenaceum* are widely spread phytopathogens, causing root rot. These fungi easily contaminate plant roots, damaged due to frosts [27]. Since even macroconidia of both *Fusarium* species are active as for ice nucleation [26], nucleating spores may contribute to microbreaks in tissues of host-plant and penetrate into them during slight frost. In the same way nucleating bacteria [18] penetrate into "host" tissues. Therefore the ability to initiate ice crystal formation under about-zero

никновению микроразрывов в тканях растения-хозяина и проникать в них во время слабых заморозков. Подобным образом в ткани “хозяина” проникают и нуклеирующие бактерии [18]. Следовательно, способность продуцировать кристаллы льда при околонулевых отрицательных температурах может быть дополнительным преимуществом нуклеирующих видов в борьбе за существование [15].

Возможно, что споры *Fusarium*, живущие в атмосфере на высоте до 6 км [26], влияют на образование облаков, как и бактерии с нуклеирующей активностью [28].

Виды *F. acuminatum* и *F. avenaceum* – симбионты в лишайниках. Именно они, а не фотобионты, отвечают за нуклеирующую активность лишайников [15]. Инициация кристаллизации не является универсальным свойством лишайников. Это можно объяснить как фенотипическими вариациями в ответ на изменение условий окружающей среды, так и генотипическими различиями видов. Kieft T.L. [14] не установил никакой корреляции между величиной нуклеирующей активности и высотой над уровнем моря, на которой находились участки сбора лишайников. Наиболее активны в отношении инициации кристаллизации лишайники, собранные со скал, в отличие от эпифитов и лишайников почв [24]. Нуклеирующей активностью обладают представители родов *Rhizoplaca*, *Xanthoparmelia* и *Xanthoria*. Для *Rhizoplaca chrysoleuca* характерна наиболее высокая нуклеирующая активность (температура нуклеации $-2,3^{\circ}\text{C}$) [16]. Активность НА лишайников гораздо выше, чем бактериальных БН, поскольку плотность зародышевых кристаллов льда, активных при -5°C , у лишайников составляет 10^6 – 10^8 кристаллов/г [14], а в листьях растений – 10^3 кристаллов/г [18] и гниющих листьях – 10^2 – 10^4 кристаллов/г [29], где нуклеирующая активность обусловлена присутствием бактерий.

Возможно, НА лишайников не связаны с клетками, так как, во-первых, для их получения в отличие от бактериальных НА детергенты не требуются [35], во-вторых, бесклеточные экстракты лишайников, полученные методом фильтрации, обладают неизменной нуклеирующей активностью [16]. Однако целлюлаза и хитиназа, мишенью которых является клеточная стенка клеток грибов, снижали нуклеирующую активность, что свидетельствует о локализации БН на клеточной стенке микобионта.

Нуклеаторы лишайников имеют белковую природу, поскольку они чувствительны к протеазам [16]. При их обработке гуанидин гидрохлоридом или мочевиной снижается либо полностью исчезает нуклеирующая активность в зависимости от концентрации реагента. Эффекты денатурирующих реагентов подтверждают предположение о том,

negative temperatures may be additional advantage of nucleating species in fighting for existence [15].

It is also possible, that *Fusarium* spores, being present in atmosphere up to 6 km height [26], affect cloud formation as well as bacteria with nucleating activity [28].

Species of *F. acuminatum* and *F. avenaceum* are symbionts in lichens. Namely they, but not photobionts are responsible for nucleating activity of lichens [15]. Initiation of crystallization is not an universal property of lichens. It may be explained not only with phenotypic variations in response to changes of environmental conditions, but also with genotypic differences between species. Kieft T.L. [14] did not establish any correlation between the nucleating activity and the sea level datum of areas where the lichens were collected. The lichens gathered on rocks possessed the highest ice crystal initiation activity unlike the epiphytes and soil lichens [24]. The nucleating activity is adherent to generitypes of *Rhizoplaca*, *Xanthoparmelia* and *Xanthoria*. The highest nucleating activity is characteristic for *Rhizoplaca chrysoleuca* (nucleating temperature is -2.3°C) [16]. INA activity of lichens is much higher than of bacterial INPs, as density of ice crystal nuclei, being active under -5°C in lichens makes 10^6 – 10^8 crystals/g [14], while in plant leaves it does 10^3 crystals/g [18] and in molding leaves, where nucleating activity is caused by bacteria, does 10^2 – 10^4 crystals/g [29].

Probably, INAs of lichens are not bound with the cells, as firstly their extraction does not require any detergent unlike to bacterial INAs [35], secondly cell-free extracts of lichens, obtained by filtration have unchanged ice nucleating activity [16]. However, adding of cellulase and chitinase, which target is fungal cell wall, reduced nucleating activity that attests to localization of INPs on mycobiont cell wall.

Ice nucleators of lichens are of protein nature, since they are sensitive to proteases [16]. After treatment of lichens with guanidine hydrochloride or urea their nucleating activity reduces or completely disappears depending on concentration of added reagent. Effects of denaturing reagents confirm the suggestion that monomers of lichenous INPs may form aggregates, which are active at high temperatures. Herewith, the reagents, modifying sulfhydryl groups, viz. iodoacetamide and N-ethylmaleimide, do not affect nucleation temperature. Probably lichenous ice nucleators contain only few sulfhydryl groups or their sulfhydryl groups are not involved directly in nucleation. Treatment of lichenous INPs with glycosidase and phenyl-boric acid (carbohydrate modifiers) does not affect their nucleating activity. This does not exclude the presence of carbohydrate component in the INP structure, however, attests to the

что мономеры лишайниковых БН могут образовывать агрегаты, активные при высоких температурах. При этом реагенты, модифицирующие сульфгидрильные группы – иодоацетамид и N-этилмалемид, не влияют на температуру нуклеации. Возможно, нуклеаторы лишайников содержат мало сульфгидрильных групп или же их сульфгидрильные группы не вовлечены непосредственно в процесс нуклеации. Обработка БН лишайников гликозидазой и фенилборной кислотой (модификаторы углеводов) не влияет на их нуклеирующую активность. Это не исключает наличия в составе БН углеводного компонента, однако свидетельствует о том, что, если таковой и имеется, то он не играет ключевой роли в процессе нуклеации. Данный факт подтверждает разную природу НА бактерий и лишайников [33]. Еще более существенным отличием БН бактерий и лишайников является отсутствие липидного компонента в составе БН последних [16]. Удаление липидов хлороформом не влияет на температуру нуклеации.

Нуклеирующие агенты лишайников, как и грибов, стабильны во всем диапазоне pH. Чрезвычайно высокая их устойчивость к изменениям pH предполагает высокое содержание незаряженных аминокислотных остатков. Повторяющаяся аминокислотная последовательность БН *Pseudomonas syringae* содержит большое количество гидрофильных незаряженных аминокислотных остатков [8], что может быть характерным и для НА лишайников. Кроме того, последние более термостабильны по сравнению с БН бактерий и более устойчивы к сонификации [14, 23].

Высокая стабильность активности НА лишайников, простота выделения и, возможно, более простая структурная организация по сравнению с бактериальными нуклеаторами делают их привлекательным объектом для использования в биотехнологии [16].

Нуклеаторы царства Растения

Сведения о НА растительного происхождения менее обширны. Сообщалось о наличии БН в листьях устойчивой к замерзанию озимой ржи *Secale cereale* [3]. Наиболее активные нуклеаторы в суспензии мезофильных клеток листьев вызывают нуклеацию при пороговой температуре -7°C и встречаются с частотой всего лишь один НА на 10^5 клеток. Авторы показали, что НА *S. cereale* представляет собой гликофосфолипогликопротеид (как и нуклеаторы бактерий [33]). Для проявления нуклеирующей активности необходимы дисульфидные связи и свободные сульфгидрильные группы. При этом состав и структура НА из мезофильных клеток ржи зависят от режима, при котором выращивались растения. Brush R.A. et al. [3] исследовали

fact that if there is any, it does not play a key role in nucleation. This fact confirms the difference in character of NAs of bacteria and lichens [33]. More significant difference between INPs of bacteria and lichens is the absence of lipid component in INP structure of the latter [16]. Removal of lipids with chloroform does not affect the nucleation temperature.

Ice nucleating agents of lichens, as well as of fungi are stable in the whole range of pH. Their extremely high tolerance to pH changes assumes a high content of uncharged amino-acid residues. Repeating amino-acid sequence of *Pseudomonas syringae* INPs contains a lot of hydrophilic uncharged amino-acid residues [8] that may be also specific for INAs of lichens. Moreover, the latter are more thermostable if compared with INPs of bacteria and more tolerant to sonification [14, 23].

High stability of lichenous INA activity, simplicity of isolation and probably more simple structure if compared with bacterial nucleators make them the attractive object for application in biotechnology [16].

Nucleating agents of Kingdom Plants

The information about INAs of plant origin is less extensive. There were reports about the presence of INPs in the leaves of freezing-tolerant winter rye *Secale cereale* [3]. The most active ice nucleators in suspension of mesophilic cells of leaves induce ice nucleation under threshold temperature of -7°C and occur with frequency only one INA per 10^5 cells. The authors showed that INA of *S. cereale* is a glycopospholipoglycoprotein (like ice nucleators of bacteria [33]). Manifestation of ice nucleating activity requires disulphide bonds and free sulfhydryl groups. Herewith, the composition and structure of INAs of rye mesophilic cells depend on conditions, under which the plants were grown. Brush R.A. et al. [3] studied three variants: a) 20°C ; b) 5°C with long photoperiod and c) 5°C with short photoperiod. Carbohydrate and phospholipid components are important parts of ice nucleators in rye leaves, when grown under 20°C , whereas protein component is more important for nucleators of leaves from plants, grown at 5°C and short photoperiod. The largest amount of INAs is produced just under these conditions.

Heterogeneous ice nucleation in *Citrus sinensis* fruits is primarily determined by the presence of nucleating bacteria *P. syringae* in plant tissues [5, 6]. Herewith the nucleation temperature is within the range of $-1.67...-2.5^{\circ}\text{C}$. However, about 29% of ice nucleation events could not be explained with the presence of *P. syringae* and they probably occur under effect of other INA. High value of ice nucleation temperature attests to the fact that this agent

три варианта режима: а) 20°C; б) 5°C при длинном фотопериоде и в) 5°C при коротком фотопериоде. Углеводный и фосфолипидный компоненты являются важными составляющими нуклеаторов из листьев ржи, выросшей при 20°C, тогда как белковый компонент более важен для нуклеаторов из листьев растений, выросших при 5°C и коротком фотопериоде. Именно в этих условиях вырабатывается больше всего НА.

Процесс гетерогенной нуклеации в плодах *Citrus sinensis*, прежде всего, определяется наличием нуклеирующих бактерий *P. syringae* в тканях растения [5, 6]. Температура нуклеации при этом находится в пределах –1,67...–2,5°C. Однако около 29% событий нуклеации нельзя объяснить присутствием *P. syringae* и они, вероятно, происходят под действием иного НА. Высокая температура нуклеации свидетельствует о том, что этот агент относится к весьма активным нуклеаторам. Он обнаруживается в микронизах, свободных от бактериальных нуклеаторов, но при этом чувствителен к ряду ингибиторов бактериальной нуклеации. Обработка протеазой и гуанидинхлоридом приводила к снижению температуры нуклеации до –4,21 и –4,52°C соответственно, однако лентинлектин практически не оказывает влияния на температуру нуклеации, что указывает на белковую природу НА цитрусовых, но в отличие от бактериальных нуклеаторов наличие углеводного компонента в нуклеаторе цитрусовых подтвердить не удалось.

Афроальпийское холодостойкое растение *Lobelia telekii* из семейства колокольчиковых подвергается заморозкам в ночной период [2]. В полых гигантских цилиндрических соцветиях лобелии накапливается большое количество вязкой слизиобразной жидкости, которая замерзает, а высвобождающаяся при этом энергия препятствует кристаллизации жидкости в других компартментах, где кристаллы льда могли бы причинить существенный вред. Считают, что инициация кристаллизации этой жидкости обусловлена присутствием крупного полисахарида, который проявляет высокую специфическую активность даже при низких концентрациях [17]. Однако не все исследователи согласны с такой интерпретацией. Например, Сое М.Д. [4] предполагает, что вязкое вещество является антифризом и способствует переохлаждению жидкостей в растительных тканях. Young Т.Р. и Van Orden Robe S. [36] считают, что данное вещество не является ни антифризом, ни нуклеатором, а представляет собой пектин, вероятно защищающий резервуар с жидкостью в соцветии от испарения и пересыхания.

Для НА, выявленных в древесных побегах персика *Prunus sp.*, характерна температура нуклеации –2°C [9]. Несмотря на то, что они инактивируются после тепловой обработки при 40...50°C,

refers to rather active nucleating agents. It is found in microniches, which are free of bacterial nucleators, but at the same time it is sensitive to some inhibitors of bacterial nucleation. The treatment with protease and guanidine chloride resulted in reduced nucleation temperature down to –4.21 and –4.52°C, accordingly, however lentin-lectin almost does not affect the nucleation temperature, indicating the protein nature of INAs of citrus plants but unlike to bacterial ice nucleators the presence of carbohydrate component in citrus plants ice nucleators was not confirmed.

Afro-Alpine cold-resistant plant *Lobelia telekii* of bellflower family is exposed to night frosts [2]. Its hollow giant cylinder-shaped inflorescences accumulate a great amount of viscous mucilaginous liquid, which freezes, releasing herewith the energy, that prevents crystallization of liquids in other compartments, where ice crystals could be harmful. It is considered that initiation of crystallization of this liquid is due to the presence of large polysaccharide, manifesting a high specific activity even under low concentrations [17]. However, not all investigators agree with such an interpretation. For example, Coe M.J. [4] believes the viscous substance as an antifreeze, promoting supercooling of liquids in plant tissues. Young T.P. and Van Orden Robe S. [36] suggest the given substance is neither antifreeze nor nucleator and it represents a pectin, probably protecting the reservoir with liquid in inflorescence from evaporation and overdrying.

INAs revealed in shoots of *Prunus sp.* peach tree are characterized by nucleation temperature of –2°C [9]. In spite of their inactivating after thermal treatment under 40...50°C they are apparently of non-protein nature as they are tolerant to action of typical inhibitors of bacterial INPs: NaOCl, tartaric acid, sulfhydryl agents (iodin and p-hydroxymercurybenzoate), detergents (Triton XQS-20) and pronase. Nucleating agents are evenly distributed in peach shoot tissues. They appear in young shoots in the second part of summer. INAs reach their maximal activity in the end of August and later their activity is not exposed to seasonal fluctuations.

Highly active INAs were found in extracellular liquid of the white fir *Abies concolor* and Chinese pyramid juniper *Juniperus chinensis* [38], however, no reports about their nature appeared afterthat. The presence of INAs is observed in the sea buckthorn *Hippophae rhamnoides* [22]. Activity of this INA depends on phospholipid component which is not phosphatidyl inositol [19].

Difference of crystallization temperatures depending on vegetation depth and season of different water-plants was studied [21]. Tallus fragments of inhabiting in upper eulittoral layer species had lower freezing temperature if compared with species from

они, по-видимому, имеют небелковую природу, так как устойчивы к действию типичных ингибиторов бактериальных БН: NaOCl, винно-каменная кислота, сульфгидрильные агенты (йодин и р-гидрокси-меркурийбензоат), детергенты (Triton XQS-20) и проназа. Нуклеирующие агенты равномерно распределены в тканях побегов персика. Они появляются в молодых побегах во второй половине лета. Максимальной активности НА достигают в конце августа, и в дальнейшем их активность не подвержена сезонным колебаниям.

Высокоактивные НА были обнаружены во внеклеточной жидкости пихты одноцветной *Abies concolor* и можжевельника китайского *Juniperus chinensis* [38], однако в дальнейшем ничего не сообщалось об их природе. Наличие НА зарегистрировано и у облепихи крушиновидной *Hippophae rhamnoides* [22]. Активность данного НА зависит от фосфолипидного компонента, который не является фосфатидилинозитолом [19].

У различных водорослей изучали разницу температур кристаллизации в зависимости от глубины произрастания и времени года [21]. Фрагменты таллуса видов, живущих в верхних слоях эулиторали, имели более низкую температуру замерзания по сравнению с видами из нижних слоев. Кроме того, образцы, собранные зимой, характеризовались более низкими температурами кристаллизации, чем собранные летом. Это свидетельствует о том, что водоросли инактивируют или удаляют НА как часть своей стратегии холодоустойчивости. Это также значит, что НА водорослей представляют собой “случайные” нуклеаторы, функции которых не связаны с кристаллообразованием, а инициация кристаллизации для них лишь побочный эффект [20].

Следует отметить, что работы, посвященные изучению НА растительного происхождения, опубликованы в 80-х – начале 90-х гг. Возможно, дальнейшие исследования поставили под сомнение сам факт существования нуклеаторов эндогенного происхождения у растений. Кроме того, отсутствие сообщений по этому вопросу может быть связано с трудностью выделения НА из растительных тканей. Так, Gross D.C. *et al.* [9] указывали на невозможность извлечения НА из древесных побегов персика озвучиванием, хотя этот метод широко применяется при выделении БН из бактерий и лишайников [16].

Если нуклеаторы бактерий являются гликолипопротеидами [33] и НА животных также, по-видимому, содержат белковый и фосфолипидный компоненты [25], нуклеаторы растений могут быть иной природы. На данный момент способность пектинов (а именно пектин предлагался на роль НА лобелии [12, 17, 36]) быть матрицей для образования кристаллов льда практически не исследована. Хими-

lower layers. In addition, the samples gathered in winter were characterized by lower crystallization temperatures than ones gathered in summer. This attests to the fact that water-plants inactivate or remove INAs as a part of their cold-tolerance strategy. It also means that the water-plant INAs represent “casual” nucleators, which functions are not associated with crystal formation and initiation of crystallization is just a side effect for them [20].

It should be noted that the papers concerning with investigation of phylogenous INAs were published in the 1980s – beginning of 1990s. Probably the further investigations doubted the fact of existence of endogenous plant nucleators. Additionally, the absence of reports on this problem may be associated with the difficult procedure for plant tissue INAs’ isolation. So, Gross D.C. *et al.* [9] pointed to impossibility of INA extraction from peach tree shoots by sonification though this method is widely applied for isolation of INPs from bacteria and lichens [16].

Whereas bacteria nucleators are glycolipoproteins [33] and animal NAs also probably contain protein and phospholipid components [25], plant ice nucleators may be of other nature. Currently, the ability of pectins (exactly pectin was proposed as lobelia INA [12, 17, 36]) serve as the matrix for ice crystal formation is almost not investigated. Chemical nature of INAs from peach and cherry tree shoots has not been studied either [9]. Thus, the initiation of crystallization as a trigger for controlled freezing as well as the mechanism of adaptation in freeze-tolerant fungi and plants are not studied completely and require further investigations.

References

1. Aunaas T. Nucleating agents in the haemolymph of an intertidal mollusc tolerant to freezing // *Experientia*.– 1982.– Vol. 38, N12.– P. 1456–1457.
2. Beck E., Schulze E.-D., Senser M. *et al.* Equilibrium freezing of leaf water and extracellular ice formation in Afroalpine “giant rosette” plants // *Planta*.– 1984.– Vol. 162, N3.– P. 276–282.
3. Brush R.A., Griffith M., Mlynarz A. Characterization and quantification of intrinsic ice nucleators in winter rye (*Secale cereale*) leaves // *Plant Physiol*.– 1994.– Vol. 104, N2.– P. 725–735.
4. Coe M.J. The ecology of the Alpine Zone of Mount Kenya.– The Hague: W. Junk, 1967.– 136 p.
5. Constantinidou H.A., Menkissoglu O. Characteristics and importance of heterogeneous nuclei associated with *Citrus* fruits // *J. Exp. Bot*.– 1992.– Vol. 43, N4.– P. 585–591.
6. Constantinidou H.A., Menkissoglu O., Stergiadou H.C. The role of ice nucleation active bacteria in supercooling of citrus tissues // *Physiologia Plantarum*.– 1991.– Vol. 81, Issue 4.– P. 548–554.
7. Duman J.G., Morris J.P., Castellino F.J. Purification and composition of an ice nucleating protein from queens of the hornet *Vespula maculata* // *J. Comp. Physiol*.– 1984.– Vol. B154, N1.– P. 79–83.

ческая природа НА из древесных побегов персика и черешни также не исследована [9]. Таким образом, инициация кристаллизации как способ контролируемого замерзания и адаптационный механизм у устойчивых к замерзанию грибов и растений пока до конца не изучены и требует дальнейших исследований.

Литература

1. Aunaas T. Nucleating agents in the haemolymph of an intertidal mollusc tolerant to freezing // *Experientia*.– 1982.– Vol. 38, N12.– P. 1456–1457.
2. Beck E., Schulze E.-D., Senser M. et al. Equilibrium freezing of leaf water and extracellular ice formation in Afroalpine “giant rosette” plants // *Planta*.– 1984.– Vol. 162, N3.– P. 276–282.
3. Brush R.A., Griffith M., Mlynarz A. Characterization and quantification of intrinsic ice nucleators in winter rye (*Secale cereale*) leaves // *Plant Physiol.*– 1994.– Vol. 104, N2.– P. 725–735.
4. Coe M.J. The ecology of the Alpine Zone of Mount Kenya.– The Hague: W. Junk, 1967.– 136 p.
5. Constantinidou H.A., Menkissoglu O. Characteristics and importance of heterogeneous nuclei associated with *Citrus* fruits // *J. Exp. Bot.*– 1992.– Vol. 43, N4.– P. 585–591.
6. Constantinidou H.A., Menkissoglu O., Stergiadou H.C. The role of ice nucleation active bacteria in supercooling of citrus tissues // *Physiologia Plantarum*.– 1991.– Vol. 81, Issue 4.– P. 548–554.
7. Duman J.G., Morris J.P., Castellino F.J. Purification and composition of an ice nucleating protein from queens of the hornet *Vespa maculata* // *J. Comp. Physiol.*– 1984.– Vol. B154, N1.– P. 79–83.
8. Green R.L., Warren G.J. Physical and functional repetition in a bacterial ice nucleation gene // *Nature (London)*.– 1985.– Vol. 317, N6038.– P. 645–648.
9. Gross D.C., Proebsting E.L., Maccrindle-Zimmerman H. Development, distribution and characteristics of intrinsic, nonbacterial ice nuclei in *Prunus* wood // *Plant Physiol.*– 1988.– Vol. 88, N3.– P. 915–922.
10. Gurian-Sherman D., Lindow S.E. Bacterial ice nucleation: significance and molecular basis // *FASEB J.*– 1993.– Vol. 7, N14.– P. 1338–1343.
11. Hayes D.R., Loomis S.H. Evidence for a proteinaceous ice nucleator in the haemolymph of the pulmonate gastropod *Melampus bidentatus* // *Cryo-Lett.*– 1985.– Vol. 6, N6.– P. 418–421.
12. Hedberg O. Features of afroalpine plant ecology // *Act. Phytoeog. Suecica*.– 1964.– Vol. 49.– P. 1–144.
13. Kawahara H. The structures and functions of ice-crystal-controlling proteins from bacteria // *J. Biosci. Bioeng.* – 2002.– Vol. 94, N6.– P. 492–496.
14. Kieft T.L. Ice nucleation activity in lichens // *Appl. Environ. Microbiol.*– 1988.– Vol. 54, N7.– P. 1678–1681.
15. Kieft T.L., Ahmadjian V. Biological ice nucleation activity in lichen mycobionts and photobionts // *Lichenologist*.– 1989.– Vol. 21, Issue 04.– P. 355–362.
16. Kieft T.L., Ruscetti T. Characterization of biological ice nuclei from a lichen // *J. Bacteriol.* – 1990.– Vol. 172, N6.– P.3519–3523.
17. Krog J.O., Zachariassen K.E., Larsen B. et al. Thermal buffering in Afro-alpine plants due to nucleating agent-induced water freezing // *Nature*.– 1979.– Vol. 282, N5736.– P. 300–301.
18. Lindow S.E. The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants // *Annu. Rev. Phytopathol.*– 1983.– Vol. 21.– P. 363–384.
19. Lundheim R. Adaptive and incidental biological ice nucleators: PhD thesis. – Trondheim: The Norwegian University of Science and Technology, 1997. – P. 14.
20. Lundheim R. Physiological and ecological significance of biological ice nucleators // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* – 2002. – Vol. 357, N 1423. – P. 937–943.
21. Lundheim R. Ice nucleation in seaweeds in relation to vertical zonation // *J. Phycol.* – 2008. – Vol. 33, Issue 5. – P. 739–742.
22. Lundheim R., Wahberg K. Ice nucleation in fruit juice from different varieties of sea buckthorn *Hippophaë rhamnoides* L. // *Euphytica*. – 1998. – Vol. 102, N 1. – P. 117–124.
23. Maki L.R., Galyon E.L., Chang-Chien M. et al. Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae* // *Appl. Microbiol.* – 1974.– Vol. 28, N3.– P. 456–459.
24. Morris C. Biological ice nucleation-active particles in the atmosphere: Microbiological Meteorology // *ESF workshop. 1–3 March 2006, INRA.*– Avignon, 2006.– P. 1–32.
25. Neven L., Duman J.G., Low M.G. et al. Purification and characterization of an insect haemolymph lipoprotein ice nucleator: Evidence for the importance of phosphatidylinositol and apolipoprotein in the ice nucleator activity // *J. Comp. Physiol.*– 1989.– Vol. 159, N1.– P. 71–82.
26. Pouleur S., Richard C., Martin J.G. et al. Ice nucleation activity in *Fusarium acuminatum* and *Fusarium avenaceum* // *Appl. Environ. Microbiol.*– 1992.– Vol. 58, N9.– P. 2960–2964.
27. Richard C., Willemot C., Michaud R. et al. Low-temperature interactions in *Fusarium* wilt and root rot of alfalfa // *Phytopathology*.– 1982.– Vol. 72, N3.– P. 293–297.
28. Schnell R.C., Vali G. Atmospheric ice nuclei from decomposing vegetation // *Nature*.– 1972.– Vol. 236, N5343.– P. 163–165.
29. Schnell R.C., Vali G. World-wide source of leaf-derived freezing nuclei // *Nature*.– 1973.– Vol. 246, N5430.– P. 212–213.
30. Storey K.B., Baust J.G., Wolanczyk J.P. Biochemical modification of plasma ice nucleating activity in a freeze-tolerant frog // *Cryobiology*.– 1992.– Vol. 29, N3.– P. 374–384.

19. *Lundheim R.* Adaptive and incidental biological ice nucleators: PhD thesis. - Trondheim: The Norwegian University of Science and Technology, 1997. - P. 14.
20. *Lundheim R.* Physiological and ecological significance of biological ice nucleators // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* - 2002. - Vol. 357, N 1423. - P. 937-943.
21. *Lundheim R.* Ice nucleation in seaweeds in relation to vertical zonation // *J. Phycol.* - 2008. - Vol. 33, Issue 5. - P. 739-742.
22. *Lundheim R., Wahberg K.* Ice nucleation in fruit juice from different varieties of sea buckthorn *Hippophaë rhamnoides* L. // *Euphytica.* - 1998. - Vol. 102, N 1. - P. 117-124.
23. *Maki L.R., Galyon E.L., Chang-Chien M. et al.* Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae* // *Appl. Microbiol.* - 1974. - Vol. 28, N3. - P. 456-459.
24. *Morris C.* Biological ice nucleation-active particles in the atmosphere: Microbiological Meteorology // ESF workshop. 1-3 March 2006, INRA. - Avignon, 2006. - P. 1-32.
25. *Neven L., Duman J.G., Low M.G. et al.* Purification and characterization of an insect haemolymph lipoprotein ice nucleator: Evidence for the importance of phosphatidylinositol and apolipoprotein in the ice nucleator activity // *J. Comp. Physiol.* - 1989. - Vol. 159, N1. - P. 71-82.
26. *Pouleur S., Richard C., Martin J.G. et al.* Ice nucleation activity in *Fusarium acuminatum* and *Fusarium avenaceum* // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1992. - Vol. 58, N9. - P. 2960-2964.
27. *Richard C., Willemot C., Michaud R. et al.* Low-temperature interactions in *Fusarium* wilt and root rot of alfalfa // *Phytopathology.* - 1982. - Vol. 72, N3. - P. 293-297.
28. *Schnell R.C., Vali G.* Atmospheric ice nuclei from decomposing vegetation // *Nature.* - 1972. - Vol. 236, N5343. - P. 163-165.
29. *Schnell R.C., Vali G.* World-wide source of leaf-derived freezing nuclei // *Nature.* - 1973. - Vol. 246, N5430. - P. 212-213.
30. *Storey K.B., Baust J.G., Wolanczyk J.P.* Biochemical modification of plasma ice nucleating activity in a freeze-tolerant frog // *Cryobiology.* - 1992. - Vol. 29, N3. - P. 374-384.
31. *Storey K.B., McDonald D.G., Duman J.G. et al.* Blood chemistry and ice nucleating activity in hatchling painted turtles // *Cryo-Lett.* - 1991. - Vol. 12, N6. - P. 351-358.
32. *Turner M.A., Arellano F., Kozloff L.M.* Three separate classes of bacterial ice nucleation structures // *J. Bacteriol.* - 1990. - Vol. 172, N5. - P. 2521-2526.
33. *Turner M.A., Arellano F., Kozloff L.M.* Components of ice nucleation structures of bacteria // *J. Bacteriol.* - 1991. - Vol. 173, N20. - P. 6515-6527.
34. *Westh P., Kristiansen J., Hvidt A.* Ice-nucleating activity in the freeze-tolerant tardigrade *Adorybiotus coronifer* // *Comp. Biochem. Physiol. PartA.* - 1991. - Vol. 99, Issue 3. - P. 401-404.
35. *Wolber P.K., Deininger C.A., Southworth M.W. et al.* Identification and purification of a bacterial ice nucleation protein // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1986. - Vol. 83, N19. - P. 7256-7260.
36. *Young T.P., Van Orden Robe S.* Microenvironmental role of a secreted aqueous solution in the Afro-Alpine plant *Lobelia keniensis* // *Biotropica.* - 1986. - Vol. 18, N3. - P. 267-269.
37. *Zachariassen K.E.* Nucleating agents in cold-hardy insects // *Comp. Biochem. Physiol.* - 1982. - Vol. 73A, N5. - P. 557-562.
38. *Zachariassen K.E., Kristiansen E.* Ice nucleation and antinucleation in nature // *Cryobiology.* - 2000. - Vol. 41, N4. - P. 257-279.

Accepted in 17.08.2010

*Поступила 17.08.2010
Рецензент В.В. Рязанцев*