

Горшкова

Горшкова Дарья Сергеевна

Исследование роли представителей семейства универсальных
стрессовых белков в регуляции роста и развития растения *Arabidopsis*
thaliana

1.5.21. – физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Лаборатории экспрессии генома растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А.Тимирязева Российской академии наук, и на кафедре физиологии растений биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Научные руководители:

доктор биологических наук, член-корреспондент РАН

Кузнецов Владимир Васильевич

кандидат биологических наук

Пожидаева Елена Станиславовна

Официальные оппоненты:

Титов Александр Федорович, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник Лаборатории экологической физиологии растений Института биологии – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

Таранов Василий Васильевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий Лабораторией стрессоустойчивости растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии".

Ведущая организация:

Уфимский Институт биологии – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (УИБ УФИЦ РАН), г. Уфа.

Защита состоится «19» апреля 2022 г. на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук 24.1.138.01 по специальности 1.5.21. – «Физиология и биохимия растений» (биологические науки) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, 35. Телефон: +7(499)678-54-20; e-mail: ifr@ippras.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, г. Москва, и на сайте <https://ippras.ru/>.

Автореферат разослан «__» _____ 2022 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук



Азаркович Марина Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Универсальные стрессовые белки (Universal Stress Proteins, USP) были впервые открыты у прокариотов как небольшие растворимые белки, накапливающиеся в ответ на широкий спектр неблагоприятных воздействий (Nystrom et al., 1992). У растений обнаружены гомологи бактериальных белков USP, выявленные на основании сходства их аминокислотных последовательностей (Kerk et al., 2003). По аналогии с прокариотами, растительные белки USP изучаются в контексте устойчивости к стрессовым условиям (Chi et al., 2019; Bhuria et al., 2019). Однако их структура и свойства предполагают, что активность USP может проявляться и вне стресса. Для представителей семейства USP характерно наличие специфического USP-домена, способного к связыванию и/или гидролизу адениловых нуклеотидов, к белок-белковым взаимодействиям, а также к участию в каскадах фосфорилирования (Ткачук et al., 2013). Схожий набор свойств характерен для белковых регуляторов, которые являются участниками внутриклеточных сигнальных путей на протяжении жизненного цикла растений, не только стрессовых, но и, например, фитогормон-зависимых процессов, регулирующих рост и развитие. Однако исследования растительных представителей семейства USP с такой точки зрения практически отсутствуют. Изучение белков USP с этой стороны позволит расширить представление о механизмах контроля жизнедеятельности растений. Исходя из этого, были сформулированы цель и задачи настоящего исследования.

Целью работы является поиск и характеристика потенциальных фитогормон-зависимых регуляторов роста и развития у растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Arabidopsis), принадлежащих к семейству белков USP. Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Используя биоинформатический подход, провести поиск USP-подобных белков у *Arabidopsis* и проанализировать их предполагаемую функциональную роль в растениях.
2. Идентифицировать гены *USP Arabidopsis*, экспрессия которых регулируется фитогормонами.
3. Охарактеризовать ген *At3g58450*, кодирующий белок GRUSP (Germination-Related Universal Stress Protein), демонстрирующий наиболее выраженный фитогормон-зависимый профиль экспрессии среди исследуемых генов *USP*.
4. Исследовать влияние, оказываемое инсерцией Т-ДНК в различные участки гена *At3g58450*, на фенотип трансгенных линий *grusp Arabidopsis* для установления функциональной роли белка GRUSP.
5. Оценить вклад белка GRUSP в процессы, контролируемые прорастание семян и переход к цветению.
6. Выявить потенциальных партнеров из семейства USP для белка GRUSP, необходимых в реализации его функциональной активности.

Научная новизна. Систематизирована информация о белках, содержащих USP-домен у *Arabidopsis*, что позволило обнаружить 91 аминокислотную последовательность, соответствующую 56 генам *USP*, и составить наиболее полный их перечень. Получена новая информация о фитогормон-зависимой экспрессии генов *USP* у *Arabidopsis*.

Впервые охарактеризован представитель семейства *USP* у *Arabidopsis*, кодируемый геном *At3g58450*, и получивший в данной работе наименование *GRUSP* (универсальный стрессовый белок, связанный с прорастанием; **G**ermination-**R**elated **U**niversal **S**tress **P**rotein). Установлено, что белок *GRUSP* является фитогормон-зависимым регулятором роста и развития растений, действующим при прорастании семян и при переходе растений к цветению. Выявлено, что ген *GRUSP* обладает специфическим профилем экспрессии с максимальным накоплением транскриптов в сухих семенах и с резким снижением их количества при набухании. Экспрессия *GRUSP* индуцируется абсцизовой кислотой (АБК) и практически полностью подавляется при воздействии гиббереллинов (ГК). Белок *GRUSP* является негативным регулятором сигнала АБК при прорастании, действуя через ABI4- и ABI5-зависимый путь. При этом *GRUSP* опосредованно стимулирует метаболизм ГК и ГК-зависимые ответы, регулируя накопление белка GAI из группы DELLA, репрессора сигнала ГК. Обнаружено участие белка *GRUSP* в индукции цветения, где его функция направлена на снижение уровня экспрессии флорального репрессора *FLC* и стимуляцию метаболизма ГК и ГК-зависимого пути при флоральной индукции. Полученные данные представляют интерес с точки зрения характеристики белков *USP* как группы потенциальных регуляторов роста и развития растений, а также для более глубокого понимания физиологических и молекулярных механизмов прорастания семян и перехода к цветению.

Практическая значимость. Полученные в рамках диссертационной работы результаты, демонстрирующие участие белков *USP* в регуляции прорастания и перехода к цветению, значительно дополняют уже известные данные о физиологических и молекулярно-биологических механизмах этих процессов. Это может служить основой при создании сортов растений с заданными характеристиками семян или с необходимым временем зацветания. Также полученные данные расширяют знания о роли и функциях белков семейства *USP* в растениях, инициируя более детальные фундаментальные исследования членов этого семейства как универсальных белковых регуляторов.

Степень достоверности работы. Данная работа проводилась с применением современных физиологических, молекулярно-генетических и биохимических методов, ранее прошедших апробацию либо оптимизированных в ходе проведения исследования. Эксперименты были проведены в трёхкратной биологической и аналитической повторностях, если не указано иное. Выводы базируются на объективных данных, полученных в ходе исследования, и изложенных в печатных

работах. Достоверность результатов подкреплена использованием в работе различных методических подходов, а также статистическим анализом.

Апробация работы. Результаты данной работы были представлены на следующих научных конференциях: Всероссийская научная конференция с международным участием «Экспериментальная биология растений и биотехнология: история и взгляд в будущее» (Москва, 2021); XXVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2021); XXVII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2020); Всероссийская научная конференция с международным участием "Физиология растений - основа создания растений будущего" (Казань, 2019); XXVI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2019); Международный конгресс по биологии растений, совместно организованный обществами FESPB и EPSO (Копенгаген, Дания, 2018).

Связь с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Работа выполнялась в 2017-2021 годах в аспирантуре кафедры физиологии растений биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова на базе Лаборатории экспрессии генома растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук при поддержке грантов РФФИ № 18-04-00043а «Характеристика универсальных стрессовых белков как мультиплексных регуляторов роста и развития у растения *Arabidopsis thaliana*» и № 19-34-90017_Аспиранты «Возможные механизмы вовлечения универсальных стрессовых белков в регуляцию морфологии семян и их прорастания». Научные положения, выводы и апробация результатов диссертации основаны на анализе данных собственных исследований автора.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 работ, из которых 4 – статьи в рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы» и «Приложение». Работа изложена на 142 страницах машинописного текста, содержит 59 рисунков и 2 таблицы. Список цитируемой литературы содержит 168 наименований, из которых 166 - на иностранных языках.

Положения, выносимые на защиту:

1. Биоинформатический анализ показал, что семейство универсальных стрессовых белков *Arabidopsis* включает в себя 56 генов, кодирующих 91 аминокислотную последовательность. Гены *USP* характеризуются органоспецифичной и фитогормон-зависимой экспрессией. Методом RT-qPCR

проанализированы 16 генов *USP*, чья экспрессия на стадии проростка регулируется более, чем двумя фитогормонами. Чувствительность к наибольшему числу фитогормонов показал ген *USP At3g58450*, экспрессия которого значительно возрастала в ответ на обработку АБК, этиленом и ауксином, но полностью подавлялась ГК.

2. Выявлено, что ген *At3g58450 Arabidopsis* кодирует белок GRUSP, чья функциональная активность связана с прорастанием. Установлена взаимосвязь между инактивацией гена *At3g58450* и нарушениями в прорастании трансгенной линии *grusp-115*. Данная линия характеризуется сверхчувствительностью к АБК при прорастании, сопряженной с более медленным снижением уровня транскриптов *ABI4* и *ABI5*. Кроме того, *grusp-115* характеризуется повышенным содержанием белка GAI семейства DELLA и сниженной экспрессией генов биосинтеза ГК. Установлено, что GRUSP является негативным регулятором передачи сигнала АБК при прорастании, действуя предположительно через регуляторные белки ABI4 и ABI5.

3. Растения *grusp-115* характеризуются поздним цветением, наиболее выраженным в условиях короткого дня. При этом фенотип частично восстанавливается обработкой экзогенными ГК. Установлено, что GRUSP вовлечен во флоральную индукцию за счет подавления экспрессии репрессора цветения *FLC*.

4. На основе данных биоинформатического анализа обнаружен потенциальный белковый партнер из семейства USP, кодируемый геном *At2g47710*, через взаимодействие с которым может осуществляться регуляторная функция GRUSP.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования и условия выращивания. Объект исследования - растение *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. экотип Columbia дикого типа (Col-0) и созданные на его основе трансгенные линии с инсерциями Т-ДНК в различных участках гена *At3g58450*: GK_115C08 (*grusp-115*), GK_562A03 (*grusp-562*) и GK_756D02 (*grusp-756*) из коллекции GABI-Kat (Kleinboelting et al., 2012, Европейский исследовательский центр NASC (Великобритания)). Семена стерилизовали 10 минут в 50% растворе гипохлорита натрия (коммерческий раствор «Белизна») с добавлением 0,02% Tween-20 и проращивали в чашках Петри на половинной питательной среде Мурасиге-Скуга (МС; Duchefa, Нидерланды), содержащей 0,8% агар. После стратификации в течение 3 суток в темноте при 4°C чашки переносили в стандартные условия в климатическую камеру (21°C, 120 мкЕ·м⁻²·с⁻¹, 16-часовой световой период (длинный день, ДД)). В возрасте 10 дней проростки переносили в почвенную культуру. Для анализа фенотипа в условиях короткого дня (КД) семена проращивали в стандартных условиях, а затем в возрасте 10 дней переносили в условия 8-часового светового периода.

Фенотипический анализ и обработка фитогормонами. Фенотипический анализ проводили, опираясь на шкалу стадий развития растений *Arabidopsis*, разработанную Boyes с соавторами (Boyes et al., 2001).

Для анализа прорастания в присутствии фитогормонов и регуляторов роста семена высаживали на среду МС, содержащую 1 или 5 мкМ АБК, 10 мкМ ГК4+7 (ГК) или 5 мкМ паклобутразола (П), ингибитора биосинтеза ГК. Использовали концентрации фитогормонов и ингибитора, исходя из ранее опубликованных исследований (Zhao et al., 2014; Liu et al., 2016). Влияние флуридона (Ф), ингибитора биосинтеза АБК, оценивали по методике Zhao с соавторами (Zhao et al., 2014). Семена выдерживали сутки при +4°C в темноте в среде МС, содержащей 100 мкМ флуридон, а затем промывали стерильной водой и пересаживали на агаризованную среду, содержащую 1 мкМ АБК. Прорастание подсчитывали с момента окончания стратификации и переноса семян в климатическую камеру в течение 7 дней.

Для анализа перехода к цветению в присутствии ГК растения в почвенной культуре, начиная с двухнедельного возраста, 2 раза в неделю опрыскивали 100 мкМ ГК (Osnato et al., 2012).

Для исследования профиля экспрессии генов *USP* при обработке фитогормонами проростки Col-0 в возрасте двух недель, выращенные в стандартных условиях, переносили на жидкую среду МС, содержащую фитогормоны в конечных концентрациях: 5 мкМ *транс*-зеатина (тЗ), 10 мкМ салициловой кислоты (СК), 5 мкМ ГК 4+7 (ГК), 50 мкМ АБК, 50 мкМ метилжасмоновой кислоты (МЖ), 1 мкМ индолилуксусной кислоты (ИУК), 10 мкМ предшественника биосинтеза этилена 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатной кислоты (АЦК). Концентрации фитогормонов подбирали аналогично используемым концентрациям в базе данных eFP Browser (<https://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). Проростки переносили в климатическую камеру в стандартные условия на 3 или 24 ч, а затем использовали для анализа генной экспрессии методом RT-qPCR.

Выделение РНК из растительных тканей и ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR). РНК из проростков, розеточных листьев и цветков выделяли с применением TRIzol-реагента по стандартному протоколу. РНК из стручков и семян выделяли методом, описанным в работе Meng и Feldman (Meng and Feldman, 2010). РНК очищали обработкой ДНКазой I, свободной от РНКаз (Thermo Scientific, США). Отсутствие примеси геномной ДНК в образцах РНК проверяли с помощью ПЦР. Обратную транскрипцию проводили с использованием олиго(dT)₁₈-праймера и обратной транскриптазы RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific). ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) проводили с использованием реакционной смеси qPCRMix-HS SYBR (Евроген, Россия) и амплификаторов АНК-32 (Синтол, Россия) и Light Cycler 96 (Roche, Швейцария). В качестве референсных генов использовались гены регуляторной субъединицы А2 протеинфосфатазы PP2A (*At3g25800*) и убиквитин-конъюгирующего фермента UBC10 (*At5g53300*).

Выделение белка и вестерн-блот анализ. Для получения экстракта тотального белка 100 мг растительного материала, предварительно замороженного в жидком азоте, гомогенизировали в 500 мкл экстракционного буфера (10 mM Трис-НСl, pH 8,0, 0,5% ЛДС, 4% глицерин, 0,1 mM ЭДТА и 1x смесь ингибиторов протеаз (Thermo Scientific)). Концентрацию белка определяли бицинхониновым методом с использованием набора для определения белка Pierce BCA assay kit (Thermo Scientific).

Разделение образцов белка (20 мкг), денатурированных при 70°C течение 5 минут, осуществляли в 12,5% Next Gel ДДС-ПААГ (Amresco, США) с использованием камеры Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, США). Иммунизацию белков на PVDF-мембраны (GE Healthcare, США) проводили в условиях полусухого переноса на приборе Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad). Вестерн-блот анализ с антителами против белка GAI (AS11 1631, Agrisera, Швеция) проводили согласно рекомендациям фирмы-производителя антител. Взаимодействие антигена с антителом выявляли иммунохимическим методом при помощи набора Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) и регистрировали на рентгеновской пленке Kodak (Kodak, США).

Программное обеспечение и электронные базы данных. Информацию о целевых генах получали на портале TAIR (arabidopsis.org).

Поиск последовательностей, содержащих USP-домен, производили в базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) при помощи инструмента DELTA-BLAST (Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST), который использует данные из базы консервативных доменов (Conserved Domain Database, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>). В качестве шаблонной последовательности USP-домена использовали последовательность белка MJ0577 из *Methanocaldococcus jannaschii* (Uniprot: Q57997, <https://www.uniprot.org/uniprot/Q57997>). Характеристику паттернов экспрессии генов USP проводили на основе данных из базы Transcriptome Variation Analysis (TraVA), интегрированных в графическую оболочку eFP Browser (<https://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). Поиск потенциальных партнеров GRUSP производили в базе данных IntAct (<https://www.ebi.ac.uk/intact/>).

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку результатов проводили при помощи программного обеспечения GraphPad Prism 6. Достоверность различий оценивали при помощи двухвыборочного теста ANOVA. На графиках и диаграммах указаны стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика белков USP у Arabidopsis. Для получения наиболее полной информации о гомологах USP в базе данных NCBI был произведен поиск аминокислотных последовательностей Arabidopsis, гомологичных

последовательности белка MJ0577 из *M. jannaschii* при помощи инструмента DELTA-BLAST. В результате была обнаружена 91 аминокислотная последовательность, соответствующая 56 генам. Множественным выравниванием подтверждено, что обнаруженные последовательности содержат в своем составе структурные элементы, соответствующие USP-домену.

Согласно материалам базы данных eFP Browser, гены обнаруженных белков USP реагируют на обработку различными фитогормонами (Горшкова и др., 2021; табл. 1).

Таблица 1. Гены *USP*, реагирующие на наибольшее число фитогормонов согласно данным транскриптомного анализа из базы eFP Browser.

Название гена	Номенклатура согласно TAIR	Фитогормоны
<i>At1g11360</i>		ГК, АБК, МЖ, тЗ, АЦК
<i>At1g77280</i>		ГК, АБК, тЗ, ИУК
<i>At2g21620</i>	RD2	ГК, АБК, АЦК, МЖ, тЗ
<i>At2g24370</i>		тЗ
<i>At2g47710</i>		ГК, АБК, тЗ
<i>At3g01520</i>		ГК, АБК, МЖ, тЗ, АЦК
<i>At3g11930</i>		ГК, АБК, МЖ, тЗ, АЦК
<i>At3g13690</i>		АБК, ИУК
<i>At3g17020</i>		ГК, АБК, тЗ
<i>At3g25930</i>		ГК, МЖ, тЗ, АЦК
<i>At3g53990</i>	AtUSP	ГК, АБК, МЖ, тЗ
<i>At3g58450</i>	GRUSP	ГК, АБК
<i>At3g62550</i>		ГК, МЖ, тЗ, АЦК
<i>At5g14680</i>		ГК, АБК, тЗ
<i>At5g47740</i>		ГК, АБК, тЗ
<i>At5g63940</i>		АБК, ИУК

Среди рассмотренных генов были выбраны 16 генов *USP*, транскрипция которых регулировалась максимальным числом фитогормонов (табл. 1). Экспрессия этих генов была проанализирована методом RT-qPCR в двухнедельных проростках Col-0, обработанных растворами фитогормонов в течение 3 и 24 ч. Наиболее выраженную реакцию в ответ на обработку фитогормонами проявил ген *At3g58450* (рис. 1). Его экспрессия возрастала на 2-3 порядка в ответ на обработку АБК, а присутствие в среде ГК его экспрессию подавляло (Горшкова и др., 2021). Кроме этого, экспрессия *At3g58450* возрастала через 24 ч воздействия АЦК и ИУК и подавлялась трехчасовой обработкой *транс*-зеатином.

Для гена *At3g58450* характерен специфический профиль экспрессии в зависимости от стадии развития (Gorshkova et al., 2018). Согласно рис. 2, максимум накопления мРНК *At3g58450* наблюдается в сухих семенах с последующим снижением при формировании проростка. В вегетативных розетках транскрипты

данного гена не детектируются в наших экспериментальных условиях, но в цветках его экспрессия вновь активируется и возрастает в стручках при созревании семян.

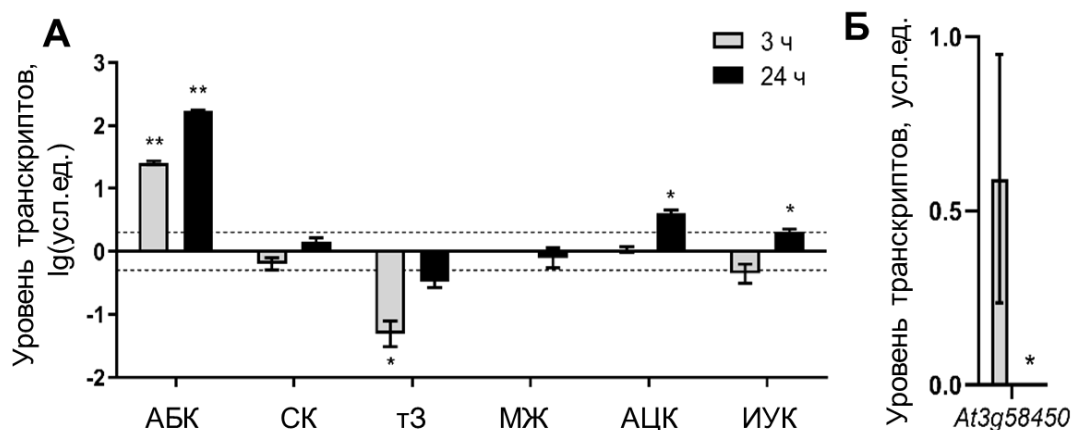


Рисунок 1. Экспрессия гена *At3g58450* в двухнедельных проростках в ответ на обработку фитогормонами в течение 3 и 24 ч. **А**, уровень экспрессии гена *At3g58450* в ответ на обработку 50 мкМ АБК, 10 мкМ СК, 5 мкМ тЗ, 50 мкМ МЖ, 10 мкМ АЦК, 1 мкМ ИУК. **Б**, уровень экспрессии гена *At3g58450* в ответ на обработку 5 мкМ ГК. Нормализация относительно уровня экспрессии гена *UBC10* и относительно уровня экспрессии соответствующих генов в необработанном контроле. Данные представлены в логарифмической форме за исключением экспрессии гена *At3g58450* в присутствии ГК по причине полного подавления его экспрессии. Тонкая пунктирная линия отмечает изменение уровня экспрессии в 2 раза по сравнению с необработанным контролем. Звездочками отмечена достоверность различий на уровне значимости: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$.

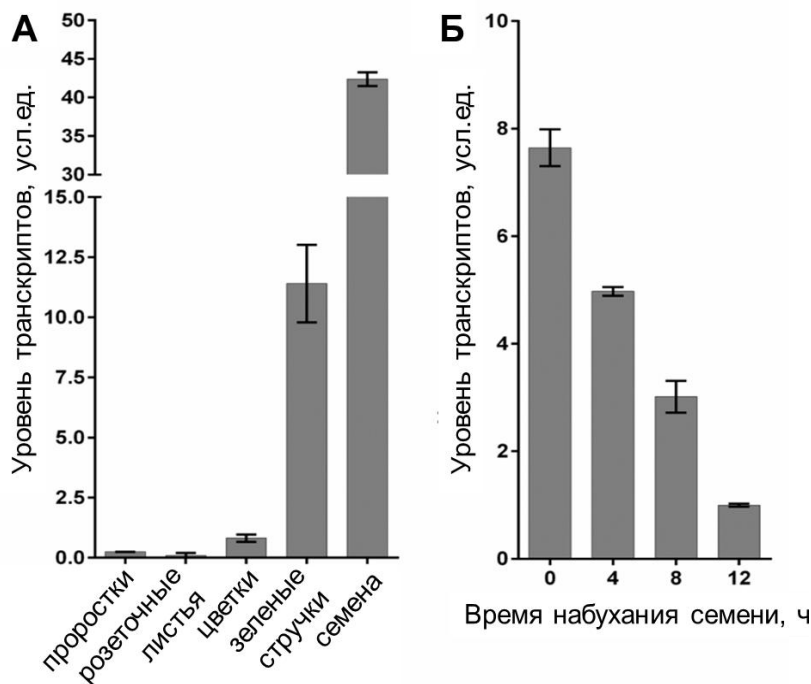


Рисунок 2. Профиль экспрессии гена *At3g58450* (*GRUSP*). **А**, уровень экспрессии *GRUSP* в зависимости от стадии развития. Нормализация относительно уровня экспрессии гена *Phos2A*. **Б**, снижение количества транскриптов *GRUSP* при набухании семян. Нормализация относительно уровня экспрессии гена *UBC10*.

Таким образом, профиль экспрессии *At3g58450* связан с семенем и прорастанием, при этом демонстрируя разнонаправленную зависимость от фитогормонов АБК и ГК, регулирующих, в том числе, эти стадии развития. В связи с

этим мы дали этому гену и соответствующему белку название Germination-Related USP (GRUSP), т.е. универсальный стрессовый белок, связанный с прорастанием.

Характеристика инсерционных мутантов *Arabidopsis* со вставкой Т-ДНК в гене *At3g58450*. Для дальнейшего исследования функции белка GRUSP нами были использованы трансгенные инсерционные линии *grusp-562*, *grusp-756* и *grusp-115* (рис. 3), несущие вставку Т-ДНК в промоторной области, 1-ом интроне и 3'-UTR гена, соответственно. Линии *grusp-115* и *grusp-562* являются гомозиготными трансгенными линиями (рис. 3 В) по Т-ДНК, но для *grusp-756* не удалось отобрать чистую линию даже спустя 5-7 поколений отбора. Несмотря на это, экспрессия GRUSP в зеленых стручках значительно снижена у *grusp-756* по сравнению с Col-0.

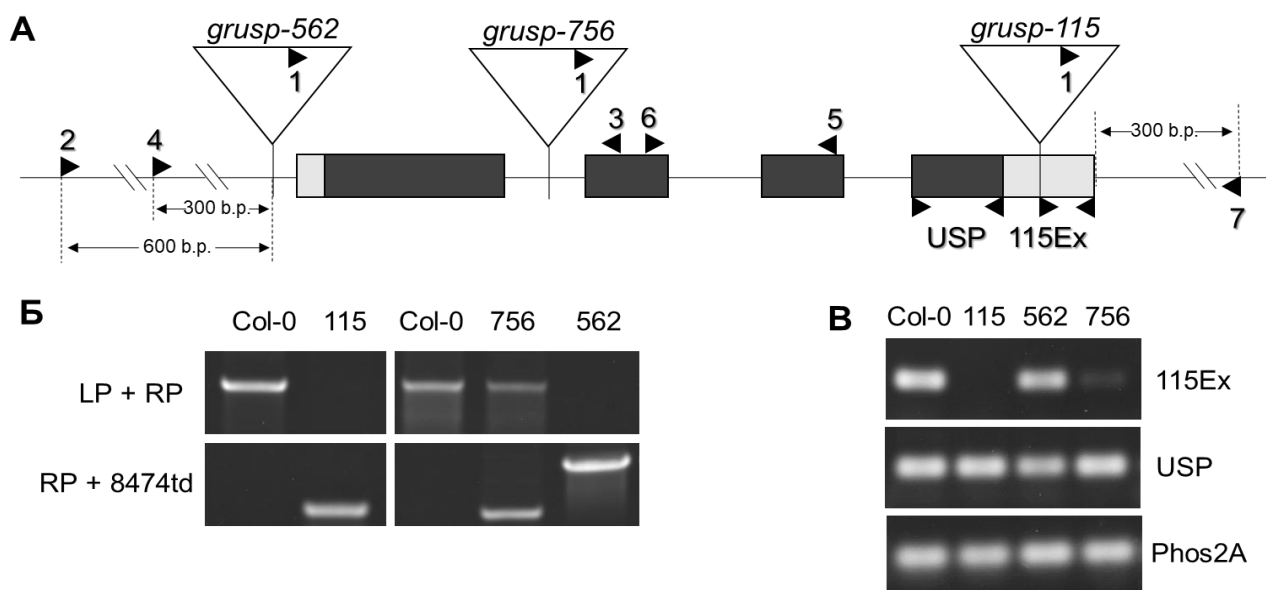


Рисунок 3. Структура гена *GRUSP* и характеристика трансгенных инсерционных линий *grusp-115* (115), *grusp-562* (562) и *grusp-756* (756). **А**, структура гена *GRUSP* и положение инсерций Т-ДНК в трансгенных линиях. Стрелками указаны позиции праймеров, используемых при анализе генотипа мутантной линии; над стрелками указаны их номера или названия: 1 – 8474td, 2 – 562_LP, 3 – 562_RP, 4 – 756_LP, 5 – 756_RP, 6 – 115_LP, 7 – 115_RP. **Б**, результат ПЦР-анализа, подтверждающий гомозиготность трансгенных линий на уровне геномной ДНК. Для анализа использовали следующие пары праймеров: LP+RP – 2+3 для *grusp-562*, 4+5 для *grusp-756*, 6+7 для *grusp-115*; RP+8474td – 3+1 для *grusp-562*, 5+1 для *grusp-756*, 7+1 для *grusp-115*. **В**, результаты анализа ОТ-ПЦР трансгенных линий на уровне мРНК, выделенной из зеленых стручков растений. Для анализа использовали пары праймеров USP и 115Ex, в качестве контроля - праймеры к гену *Phos2a*.

Линия *grusp-562* характеризуется измененным уровнем экспрессии данного гена на разных стадиях развития (рис. 4), поскольку наличие Т-ДНК в области промотора привело к нарушению регуляции транскрипции *At3g58450*. В отличие от Col-0, у

данной линии не наблюдается полной репрессии транскрипции гена *At3g58450* в ходе развития трансгенных растений.

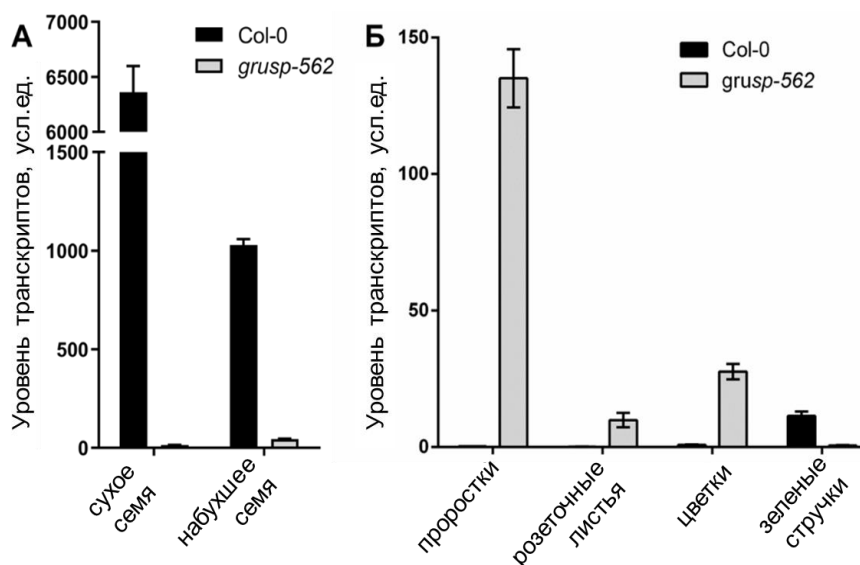


Рисунок 4. Профиль экспрессии гена *GRUSP* на разных стадиях развития *grusp-562* по сравнению с *Col-0*. **А**, экспрессия *GRUSP* при набухании семян *grusp-562*. **Б**, экспрессия *GRUSP* в зависимости от стадии развития *grusp-562*. Нормализация относительно уровня экспрессии гена *UBC10*.

GRUSP участвует в регуляции прорастания. На рис. 5 представлена диаграмма развития всех трансгенных линий по сравнению с *Col-0* в течение 10 дней после переноса на свет. Согласно рис. 5, *grusp-115* и *grusp-756* завершают прорастание и переходят к формированию семядолей лишь на пятый день развития в присутствии 1 мкМ АБК, в отличие от *Col-0*. В то же время *grusp-562* практически не отличается от *Col-0* как в нормальных условиях, так и в присутствии АБК. Торможение в развитии линий *grusp-115* и *grusp-756* значительно усиливается при увеличении концентрации АБК в среде. При концентрации АБК 5 мкМ развитие *grusp-115* и *grusp-756* останавливается на стадии зародышевого корешка, в то время как у *Col-0* и *grusp-562* семядоли успевают появиться.

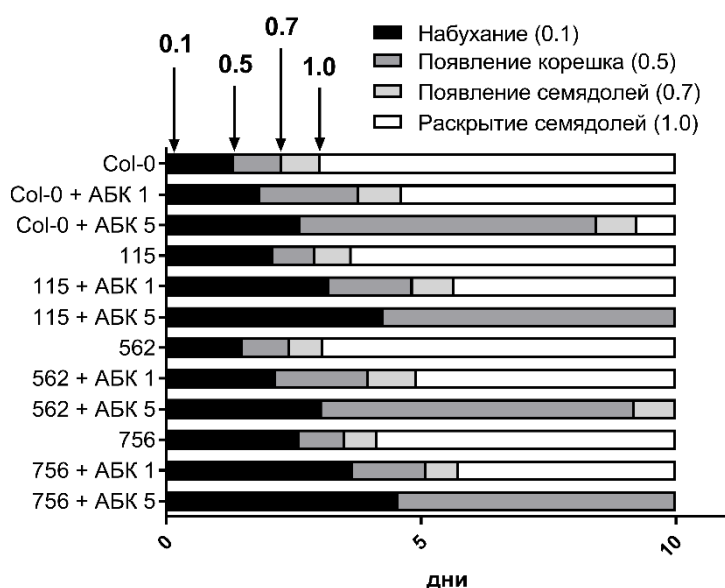


Рисунок 5. Диаграмма развития при прорастании *grusp-115*, *grusp-562* и *grusp-756* в нормальных условиях и в присутствии АБК по сравнению с *Col-0*. Семена высаживали на среду, содержащую 1 (АБК 1) или 5 (АБК 5) мкМ АБК. Указанные стадии соответствуют стандартной классификации стадий развития *Arabidopsis*, описанной в работе Boyes et al., 2001.

Сверхчувствительность к АБК при прорастании может быть вызвана либо повышенным содержанием АБК в тканях, либо увеличенной активностью компонентов ее сигнального пути. Эксперимент с обработкой семян ингибитором биосинтеза АБК флуридоном показывает, что на седьмой день прорастания среди растений линий *grusp-115* и *grusp-756* в присутствии АБК семядоли сформированы лишь у 30-40% проростков; предобработка флуридоном увеличила это количество лишь до 60% (рис. 6). При этом без гормонального присутствия проростки из предобработанных флуридоном семян сформировались полностью у всех четырех линий. Таким образом, предобработка ингибитором биосинтеза АБК не снимает отставания при прорастании, что указывает на возможные нарушения чувствительности к АБК у трансгенных линий.

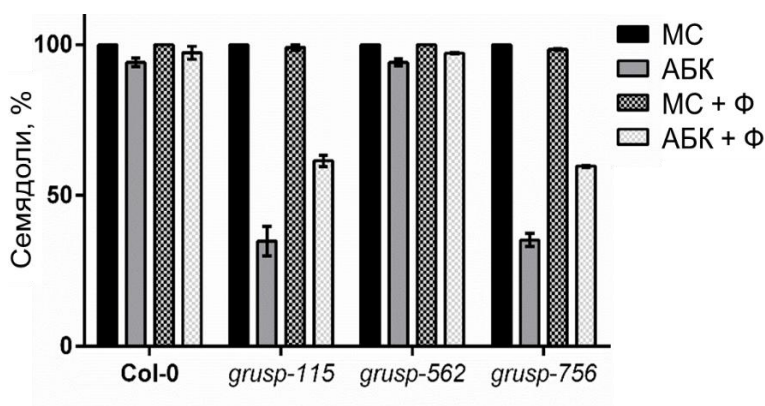


Рисунок 6. Количество раскрытых семядолей у *grusp-115*, *grusp-562* и *grusp-756* по сравнению с Col-0 на седьмой день прорастания в нормальных условиях и в присутствии 1 мкМ АБК с предобработкой флуридоном (+ Φ) или без нее.

О возможном нарушении сигнальных путей АБК свидетельствуют и результаты анализа экспрессии генов. Согласно рис. 7, в сухих семенах нет разницы между Col-0 и *grusp-115* в уровне транскриптов ключевых регуляторов ответа на АБК – *ABI4* и *ABI5*. Однако спустя 24 часа набухания семени уровень транскриптов *ABI4* и *ABI5* гораздо выше у *grusp-115*, чем у Col-0. Поскольку при прорастании необходимо быстро подавить процессы, связанные с передачей сигнала АБК (Finch-Savage et al., 2006), эти результаты могут косвенно подтверждать, что у *grusp-115* это подавление происходит медленней, чем у дикого типа.

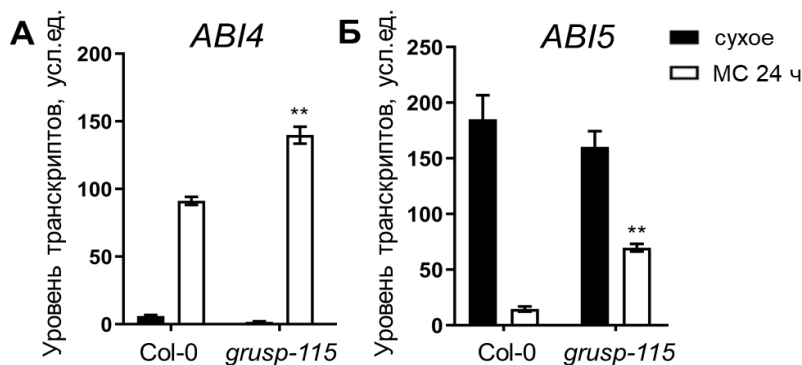


Рисунок 7. Экспрессия генов регуляторов ответа на АБК в сухих и набухающих семенах *grusp-115* по сравнению с Col-0. Семена набухали 24 часа в жидкой среде МС. Нормализация относительно уровня экспрессии гена *UBC10*. Звездочками

отмечена статистическая достоверность различий между Col-0 и трансгенными линиями в рамках одного эксперимента: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$.

Такое поведение линии *grusp-115* с полной инактивацией гена *GRUSP* позволяет предположить, что *GRUSP* является негативным регулятором сигнала АБК, действующим через *ABI4/ABI5*: сигнал АБК вызывает индукцию экспрессии *GRUSP*, который пока еще не известным способом подавляет *ABI4* и *ABI5*, что вызывает снижение интенсивности сигнала АБК.

Антагонизм ГК и АБК играет ключевую роль в физиологии покоя и прорастания семени. Согласно рис. 8 А, гиббереллины ускоряют прорастание семян Col-0, однако не оказывают значительного воздействия на прорастание *grusp-115*: в присутствии 10 мкМ ГК4+7 в первый день прорастания зародышевый корешок виден лишь у 15% семян в сравнении с 10% проросших семян в отсутствие ГК. Ингибитор биосинтеза гиббереллинов паклобутразол, напротив, обладает выраженным эффектом: спустя 7 дней прорастания в присутствии 5 мкМ П прорастает не более 15% семян *grusp-115* по сравнению с 65-70% семян дикого типа (Gorshkova et al., 2021a).

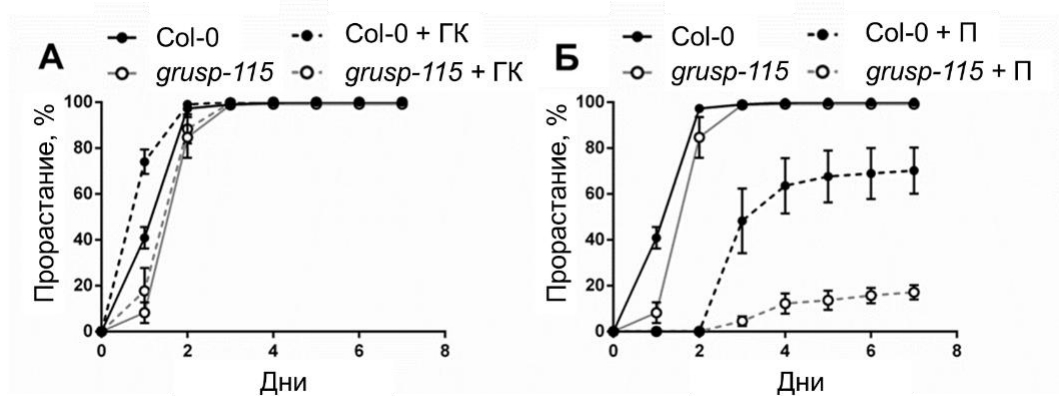


Рисунок 8. Прорастание семян трансгенной линии *grusp-115* по сравнению с Col-0 в нормальных условиях и в присутствии 10 мкМ ГК (А) или 5 мкМ паклобутразола (П) (Б). Каждое измерение производилось в двух биологических повторностях по 100-200 семян на чашку.

Этот фенотип имеет сниженный уровень экспрессии генов *GA20ox1* и *GA3ox1*, контролирующих заключительные этапы биосинтеза ГК, у *grusp-115* (рис. 9). Результатом этого является потенциальный дефицит гиббереллинов в семенах и проростках *grusp-115*, на что косвенно указывает сверхчувствительность этой линии к паклобутразолу при прорастании (Gorshkova et al., 2021a).

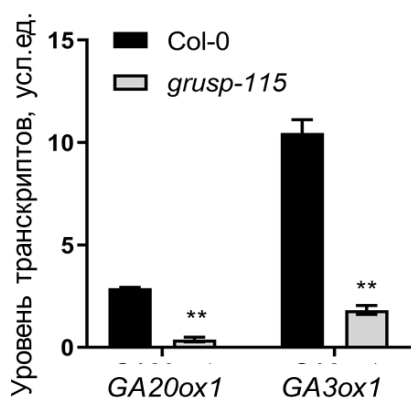


Рисунок 9. Экспрессия генов, ассоциированных с метаболизмом ГК, в 10-дневных проростках *grusp-115* по сравнению с Col-0. Нормализация относительно уровня экспрессии гена *UBC10*. Звездочками отмечена статистическая достоверность различий между Col-0 и трансгенными линиями: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$.

С другой стороны, линия *grusp-115* характеризуется низкой чувствительностью к ГК (Gorshkova et al., 2021a). Ключевыми регуляторами чувствительности тканей к ГК являются белки из группы DELLA – репрессоры гиббереллинового ответа; сигнал ГК реализуется преимущественно через их деградацию (Dill et al., 2004). Мы проанализировали количество DELLA-белка GAI в проростках *grusp-115* в присутствии ГК или П по сравнению с Col-0, используя метод вестерн-блот гибридизации тотальных экстрактов белка из 10-дневных проростков со специфическими антителами к GAI. Согласно рис. 10, в проростках *grusp-115* уровень GAI выше, чем у Col-0, как в нормальных условиях, так и в присутствии ГК или П. Тем не менее, в присутствии ГК количество GAI в проростках *grusp-115* снижается, что соответствует нормальному ответу на обработку ГК.

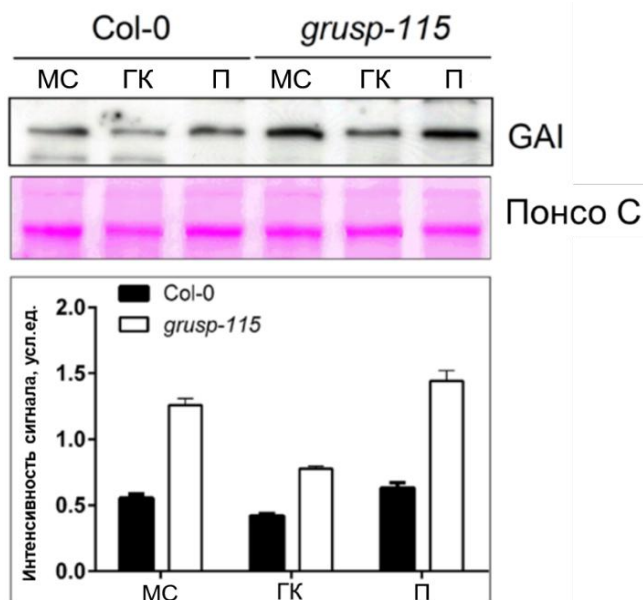


Рисунок 10. Содержание белка GAI в проростках Col-0 и *grusp-115* в ответ на присутствие ГК или П. Тотальные экстракты белка были получены из 10-дневных проростков, росших в присутствии 10 мкМ ГК 4+7 или 5 мкМ П. 20 мкг белка наносили на гель и анализировали методом вестерн-блот гибридизации со специфическими антителами против GAI. Интенсивность сигнала была измерена при помощи программного обеспечения ImageJ.

Таким образом, чувствительность к ГК у *grusp-115* не нарушена, а лишь снижена по интенсивности (Gorshkova et al., 2021a). Причиной этому может быть то, что GRUSP воздействует на метаболизм ГК не напрямую, а опосредованно через АБК-зависимые пути, поскольку семя при прорастании не способно воспринимать сигнал ГК, пока не будет до необходимого уровня подавлен сигнал АБК (Finch-Savage et al.,

2006). А поскольку у *grusp-115* при прорастании АБК-зависимые ответы подавляются медленней, этим можно объяснить наблюдаемую нечувствительность к ГК на ранних этапах прорастания.

GRUSP участвует в регуляции перехода к цветению. Помимо прорастания, GRUSP также является потенциальным участником регуляции перехода к цветению (Gorshkova et al., 2021b). Оба этих процесса регулируются с участием ГК-зависимой индукции и АБК-зависимого подавления (Shu et al., 2018b). Роль ГК при переходе к цветению зависит от фотопериода: в условиях длинного дня (ДД) фотопериодический путь индукции играет основную роль, а гиббереллины – вспомогательную, ускоряя переход к цветению (Galvao et al., 2012, Porri et al., 2012); в условиях короткого дня (КД) ГК критически необходимы для флоральной индукции (Wilson et al., 1992).

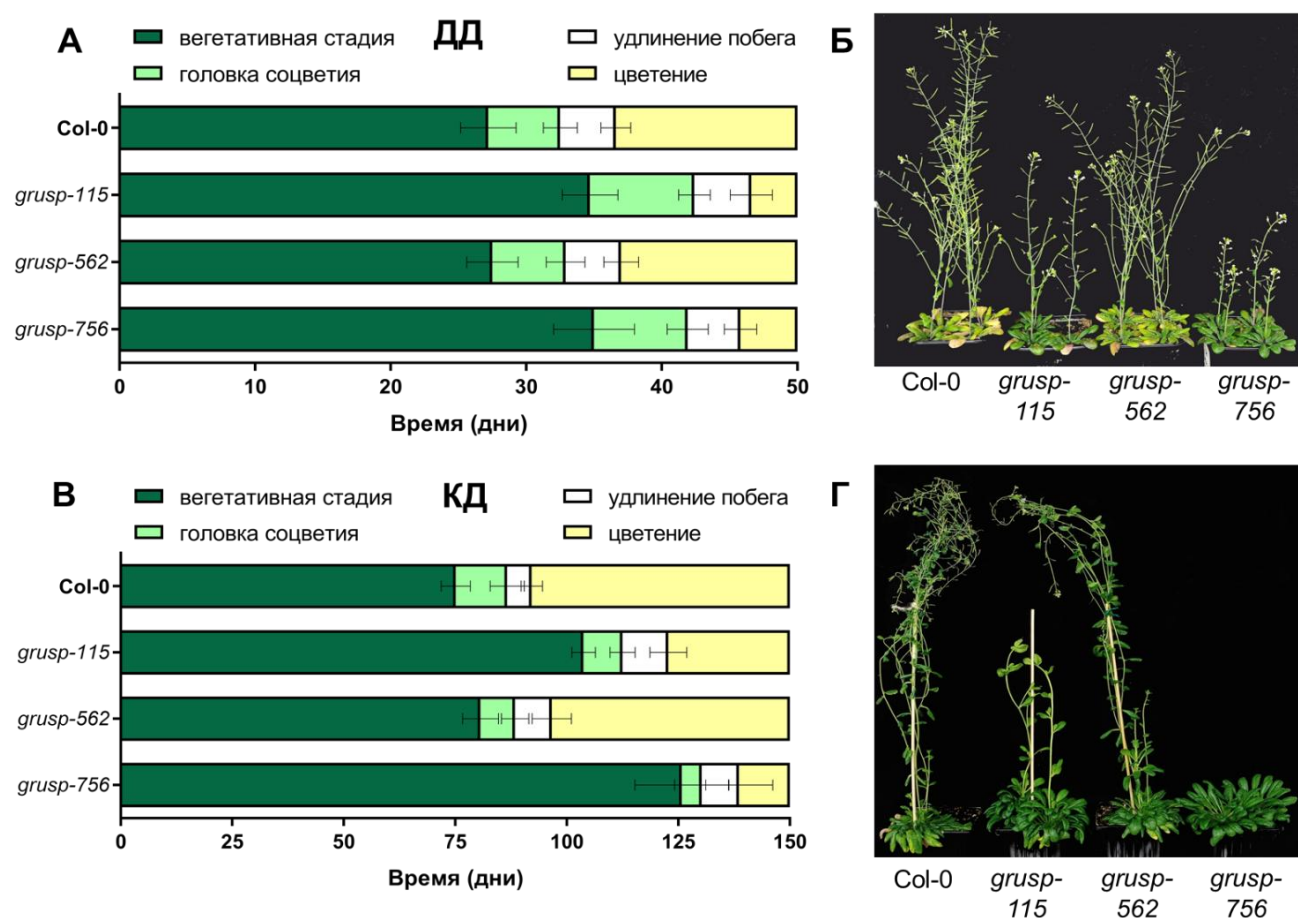


Рисунок 11. Фенотип линий *grusp-115*, *grusp-562* и *grusp-756* по сравнению с Col-0 в различных фотопериодических условиях. **А**, диаграмма стадий развития для линий *grusp-115*, *grusp-562* и *grusp-756* в условиях ДД. **Б**, внешний вид растений линий *grusp-115*, *grusp-562* и *grusp-756* в условиях ДД в возрасте 50 дней. **В**, диаграмма стадий развития для линий *grusp-115*, *grusp-562* и *grusp-756* в условиях КД. **Г**, внешний вид растений линий *grusp-115*, *grusp-562* и *grusp-756* в условиях КД в возрасте 120 дней.

Согласно рис. 11 А, растения *grusp-115* и *grusp-756* в условиях ДД находятся в вегетативном состоянии около 35 дней, что на 7-10 дней дольше дикого типа (Gorshkova et al., 2021b), в то время как *grusp-562* практически не отличается от Col-0. В условиях КД отставание *grusp-115* и *grusp-756* при переходе к цветению увеличивается вплоть до месяца. Обработка ГК ускоряет цветение, но не устраняет этого промежутка полностью (рис. 12): разница в 7-10 дней сохраняется при обработке *grusp-115* ГК как в условиях ДД, так и КД. Это значит, что в отсутствие GRUSP в регуляторной цепи перехода к цветению изменен некий фактор, который не дает растению развиваться и расти быстрее.

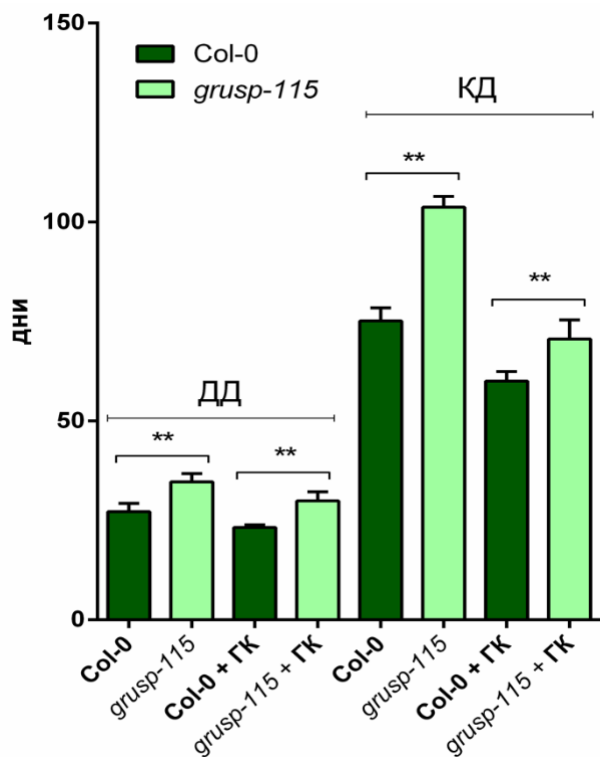


Рисунок 12. Время перехода к цветению *grusp-115* в ответ на обработку 100 мкМ ГК и на фотопериодические условия. Звездочками отмечена статистическая достоверность различий между Col-0 и *grusp-115* в рамках одного эксперимента: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$.

Этим предполагаемым фактором может быть флоральный репрессор FLC (Yan et al., 2010). Согласно рис. 13, *grusp-115* демонстрирует более высокий уровень транскриптов *FLC* при переходе к цветению, что согласуется с ее фенотипом удлиненной вегетативной стадии.

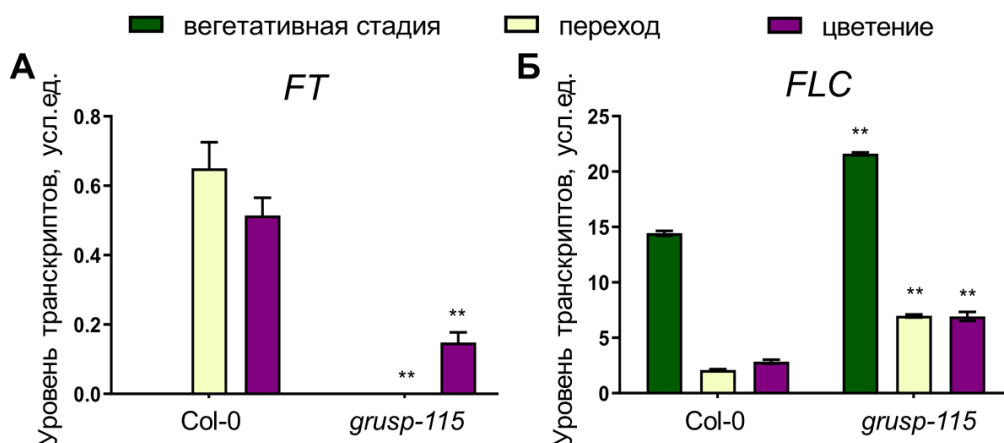


Рисунок 13. Уровень экспрессии генов *FT* и *FLC*, вовлеченных в регуляцию цветения, у линий *grusp-115*, *grusp-562* и *grusp-756* на различных стадиях развития при росте в условиях КД. «Вегетативная стадия» - возраст растений 60 дней, все растения находятся в состоянии вегетативных розеток; «переход» - возраст растений 90 дней, *Col-0* и *grusp-562* имеют хорошо сформированные соцветия, *grusp-115* и *grusp-756* в вегетативном состоянии; «цветение» - возраст растений 140 дней, все растения имеют хорошо сформированные соцветия. Звездочками отмечена статистическая достоверность различий между трансгенными линиями и *Col-0* в рамках одного эксперимента: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$.

Поскольку *FLC* подавляет экспрессию генов гиббереллиновых оксидаз (Andres et al., 2012), возрастание транскриптов *FLC* у *grusp-115* приводит не только к торможению развития, но и к формированию возможного дефицита по ГК, о чем свидетельствует реакция *grusp-115* на обработку ГК. Таким образом, GRUSP так или иначе задействован во флоральной индукции, вызывая подавление экспрессии *FLC*. Возможно, этот механизм также реализуется через подавление АБК-зависимого ответа на уровне *ABI4/ABI5*, как и в случае прорастания, поскольку *ABI4* и *ABI5* тормозят цветение, стимулируя экспрессию гена *FLC* (Wang et al., 2013, Shu et al., 2016). Однако для доказательства этого утверждения требуются более детальные исследования.

Потенциальные партнеры GRUSP. В соответствии со свойствами USP-домена одним из механизмов функционирования GRUSP может быть взаимодействие с белковыми партнерами. Согласно материалам базы данных IntAct, у GRUSP имеется один предполагаемый партнер, кодируемый геном *At2g47710* и также относящийся к семейству белков USP. В свою очередь, белок *AT2G47710* обладает большим набором других потенциальных партнеров, помимо GRUSP (табл. 2).

Таблица 2. Потенциальные партнеры белка AT2G47710 согласно материалам базы данных IntAct.

Название гена	Номенклатура согласно TAIR	Аннотация согласно TAIR
<i>At3g58450</i>	GRUSP	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein
<i>At3g11930</i>		Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein
<i>At5g03240</i>	UBQ3	polyubiquitin 3
<i>At3g49160</i>		pyruvate kinase family protein
<i>At2g44970</i>		alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
<i>At2g01760</i>	ARR14	response regulator 14
<i>At2g32840</i>		proline-rich family protein
<i>At4g38060</i>	CCI2	hypothetical protein
<i>At2g41760</i>	NTAQ1	amino-terminal glutamine amidohydrolase

Присутствие убиквитина среди возможных партнеров AT2G47710 может указывать на важную роль AT2G47710 в контроле процесса убиквитинирования белков, являющегося одним из основных регуляторных механизмов растительной клетки, в том числе и при передаче сигнала АБК и ГК (деградация белков DELLA (Dill et al., 2004) или ABI5 (Scubacz et al., 2016)).

Другим потенциальным партнером AT2G47710 является N-концевая амидогидролаза глутамин NTAQ1, которая модифицирует глутамин на N-конце белков, обеспечивая их узнаваемость для специфических убиквитин-лигаз (Graciet et al., 2010). Этот механизм играет важную роль в жизни растений, в том числе и в регуляции чувствительности к АБК при прорастании семян (Holman et al., 2009).

Кроме того, возможным партнером AT2G47710 является цитокинин-зависимый регулятор ответа ARR14. Гены *At2g47710* и *GRUSP* демонстрировали небольшое подавление экспрессии цитокининами в первые 3 часа обработки, что, возможно, указывает на неисследованную еще взаимосвязь их с передачей сигнала цитокининов.

В то же время среди возможных партнеров AT2G47710 есть USP-белок AT3G11930, который демонстрирует значительное сходство с GRUSP. Однако инактивация гена *At3g11930* не отразилась на фенотипе соответствующей мутантной линии по сравнению с Col-0. Возможно, GRUSP и AT3G11930 участвуют в различных процессах, либо же функция GRUSP частично дублирует функцию AT3G11930. Этот вопрос также остается предметом для будущих исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Семейство белков USP является обширной, но малоизученной группой растительных белков. В данном исследовании у *Arabidopsis* обнаружено как минимум 56 генов, кодирующих 91 последовательность белков семейства USP. Роль белков USP растений рассматривают преимущественно в контексте устойчивости к стрессовым факторам. В данной работе было впервые показано, что функции белков этого семейства не ограничены формированием устойчивости к стрессу, а могут затрагивать такие процессы, как регуляция прорастания семени и перехода растений к цветению. Примером такого белка является описанный в данной работе GRUSP – белок из семейства USP, кодируемый геном *At3g58450 Arabidopsis*.

Данное исследование показало, что GRUSP является негативным регулятором сигнала АБК при прорастании. Этот вывод был сделан на основе следующих фактов: во-первых, профиля экспрессии гена GRUSP с максимумом в сухих семенах и с индукцией в ответ на обработку АБК; и, во-вторых, на основе фенотипа трансгенной линии *grusp-115*, проявляющей сверхчувствительность к присутствию АБК при прорастании. Учитывая, что линия *grusp-115* накапливает увеличенное количество транскриптов регуляторов ответа на АБК *ABI4* и *ABI5* при прорастании, а также учитывая данные транскриптомики, где в семенах мутантов *abi5* и *abi4/abi5* накопление транскриптов GRUSP значительно снижено (Nakabayashi et al., 2005, Reeves et al., 2011), можно предположить, что GRUSP и ABI4/ABI5 формируют регуляторную петлю с отрицательной обратной связью: интенсивный сигнал АБК вызывает индукцию экспрессии GRUSP через ABI4/ABI5; в свою очередь, GRUSP пока еще не известным способом подавляет активность ABI4 и ABI5, и, как следствие, интенсивность сигнала АБК снижается (рис. 14 А). Поскольку антагонистами АБК при прорастании являются гиббереллины, то действие GRUSP косвенно затрагивает метаболизм ГК и чувствительность к гиббереллиновому сигналу (рис. 14 А).

Исследования, выполненные в данной работе, показали, что GRUSP также вовлечен в регуляцию перехода к цветению через негативную регуляцию экспрессии гена флорального репрессора *FLC* (рис. 14 Б). Об этом свидетельствует отставание линии *grusp-115* при переходе к цветению, сопряженное с повышенным накоплением транскриптов *FLC*. Возможно, этот процесс также протекает с участием ABI4 и ABI5, поскольку взаимодействие этих факторов с *FLC* при регуляции цветения показано ранее экспериментально (Wang et al., 2013, Shu et al., 2016). Однако в данном исследовании экспериментальных подтверждений этому получить не удалось; эта тема остается предметом будущих исследований.

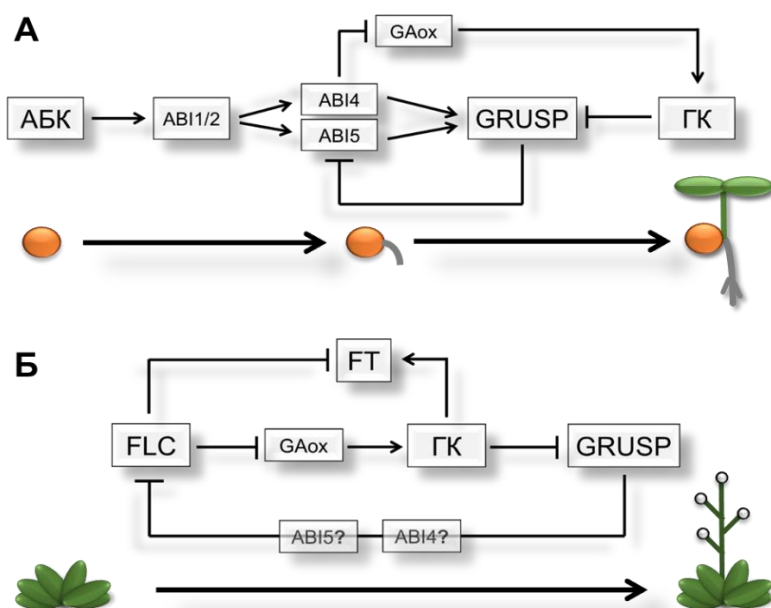


Рисунок 14. Предполагаемый механизм участия GRUSP в регуляции прорастания (А) и перехода к цветению (Б).

Анализ свойств USP-домена позволяет предположить, что основной механизм реализации функции GRUSP на молекулярном уровне – взаимодействие с белковыми партнерами. Для GRUSP на основе анализа баз данных обнаружен партнер из семейства USP, кодируемый геном *At2g47710*. В свою очередь, для этого белка обнаружен ряд потенциальных партнеров, среди которых – убиквитин, NTAQ1, ARR14, а также еще один USP-белок, кодируемый геном *At3g11930*. Набор этих партнеров позволяет предположить широкие регуляторные возможности для белка GRUSP.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что семейство универсальных стрессовых белков (USP) у *Arabidopsis thaliana* представлено 91 белковой последовательностью, кодируемой 56 генами.

2. Обнаружена фитогормон-зависимая экспрессия у 16 генов USP, при этом максимальный эффект наблюдался при действии абсцизовой кислоты, этилена и метилжасмоната.

3. Среди изученных генов USP наиболее выраженную чувствительность к фитогормонам обнаружили у гена *At3g58450*, экспрессия которого значительно возрастала в ответ на обработку абсцизовой кислотой, этиленом и ауксином, но полностью подавлялась при обработке гиббереллинами. Показано, что ген *At3g58450* обладает органоспецифичной экспрессией с максимальным накоплением транскриптов в цветках, зелёных стручках и сухих семенах, и их отсутствием в розеточных листьях.

5. Исследование показало, что ген *At3g58450* кодирует белок GRUSP (Germination-Related USP), чья функциональная активность связана с прорастанием.

Установлено, что GRUSP является негативным регулятором передачи сигнала АБК при прорастании, действуя предположительно через регуляторные белки ABI4 и ABI5.

6. Выявлена прямая зависимость между инактивацией гена *At3g58450* и замедленным подавлением АБК-зависимых ответов, сниженной экспрессией генов биосинтеза ГК и увеличенным накоплением DELLA-белка GAI при прорастании семян и развитии проростков.

7. Одновременно с нарушениями в прорастании семян трансгенные линии *grusp* демонстрировали отставание в цветении. Установлено, что GRUSP вовлечен во флоральную индукцию за счет подавления экспрессии репрессора цветения *FLC*.

8. Для GRUSP определен потенциальный партнер из семейства USP, кодируемый геном *At2g47710*, который, в свою очередь, взаимодействует с белком USP, кодируемый геном *At3g11930*.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В журналах, рекомендованных ВАК:

1. Горшкова Д.С., Пожидаева Е.С. Влияние фитогормонов на экспрессию генов USP в проростках *Arabidopsis thaliana* // Вестник Московского университета. 2021. Т. 76. № 4. С. 241.

2. Gorshkova D.S., Getman I.A., Sergeeva L.I., Kuznetsov V.I., Pojidaeva E.S. GRUSP, an universal stress protein, is involved in gibberellin-dependent induction of flowering in *Arabidopsis thaliana* // Doklady Biochemistry and Biophysics. 2021b. V. 499. N. 1. P. 233.

3. Gorshkova D.S., Pojidaeva E.S. Members of the Universal Stress Protein family are indirectly involved in gibberellin-dependent regulation of germination and post-germination growth // Russian Journal of Plant Physiology. 2021a. V. 68. No. 3. P. 451.

4. Gorshkova D.S., Getman I.A., Voronkov A.S., Chizhova S.I., Kuznetsov V.I., Pojidaeva E.S. The gene encoding the universal stress protein AtUSP is regulated by phytohormones and involved in seed germination of *Arabidopsis thaliana* // Doklady Biochemistry and Biophysics. 2018. V. 479. N. 1. P. 105.

В прочих изданиях:

1. Горшкова Д.С., Пожидаева Е.С. Универсальные стрессовые белки и их партнеры в регуляции прорастания *Arabidopsis thaliana* // Всероссийская научная конференция с международным участием «Экспериментальная биология растений и биотехнология: история и взгляд в будущее». Москва, 2021. С. 232. ISBN 978-5-4465-3388-6.

2. Горшкова Д.С. Универсальные стрессовые белки в регуляции перехода к цветению у *Arabidopsis thaliana*. // XXVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов». Москва, 2021. ISBN 978-5-317-06593-5.

3. Горшкова Д.С. Универсальные стрессовые белки и их партнеры в регуляции жизненного цикла *Arabidopsis thaliana*. // XXVII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов». Москва, 2020. ISBN 978-5-317-06519-5.

4. Горшкова Д.С., Гетман И.А., Сергеева Л.И., Воронков А.С., Пожидаева Е.С. Роль представителя USP-подобных белков в регуляции баланса гиббереллинов и абсцизовой кислоты у *Arabidopsis thaliana*. // Всероссийская научная конференция с международным участием "Физиология растений - основа создания растений будущего". Казань, 2019. С. 133.

5. Горшкова Д.С. Вклад представителя семейства универсальных стрессовых белков в регуляцию прорастания семян у *Arabidopsis thaliana* // XXVI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов». Москва, 2019. ISBN 978- 5- 317- 06100- 5.

6. Gorshkova D.S., Sergeeva L.I., Getman I.A., Pojidaeva E.S. The role of plant homologue of USP protein family as a novel member of phytohormone-mediated growth responses // Plant Biology Europe 2018 Conference. Copenhagen, 2018. P. 342. ISBN: 978-87-996274-1-7.

7. Горшкова Д.С., Гетман И.А., Чижова С.И., Пожидаева Е.С. Мутация в гене универсального стрессового белка UspA приводит к изменениям в росте и развитии растений *Arabidopsis thaliana*, а также к сниженной чувствительности к гиббереллинам. // Всероссийская научная конференция с международным участием «Современные аспекты структурно - функциональной биологии растений: от молекул до экосистем». Орел, 2017. С. 295 – 303.