

*На правах рукописи*

**НАРАЙКИНА НАТАЛЬЯ ВЛАДИМИРОВНА**

**ОСОБЕННОСТИ ЗАКАЛИВАНИЯ ХОЛОДОСТОЙКИХ  
РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ К ГИПОТЕРМИИ И РОЛЬ  $\Delta$ 12-  
АЦИЛ-ЛИПИДНОЙ ДЕСАТУРАЗЫ**

03.01.05. – физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2017

Работа выполнена в лаборатории зимостойкости Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук

**Научный руководитель:** **Трунова Тамара Ильинична**  
доктор биологических наук, профессор

**Официальные оппоненты:** **Живухина Елена Александровна**  
кандидат биологических наук, доцент,  
ФГБОУ ВО Московский педагогический  
государственный университет,  
доцент кафедры ботаники

**Таланова Вера Викторовна**  
доктор биологических наук,  
ФГБУН Институт биологии Карельского  
научного центра РАН,  
главный научный сотрудник  
лаборатории экологической физиологии растений

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа.

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г. в 11 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, г. Москва, Ботаническая ул., 35. Факс: (499) 977-80-18; e-mail: [ifr@ippras.ru](mailto:ifr@ippras.ru); [m-azarkovich@ippras.ru](mailto:m-azarkovich@ippras.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук [www.ippras.ru](http://www.ippras.ru)  
Автореферат разослан «\_\_» апреля 2017 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Азаркович Марина Ивановна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Известно, что низкая температура оказывает негативное влияние на все процессы жизнедеятельности растений, определяет их географическое распределение на Земле и является одним из основных экологических факторов, ограничивающих сельскохозяйственную продуктивность растений. Несмотря на существенные достижения в области исследования физиологических и молекулярных основ адаптации растений к гипотермии (Туманов, 1979; Levitt, 1980; Дроздов и др., 1984; Sakai, Larcher, 1987; Лукаткин, 2002; Титов и др., 2006; Трунова, 2007; Theocharis, 2012; Войников, 2013; John et al., 2016 и др.), изучение механизмов формирования устойчивости к низкой температуре остается актуальной проблемой физиологии растений.

По устойчивости к низким температурам растения делятся на три группы (Туманов, 1979): теплолюбивые повреждаются при температуре ниже 10°C; холодостойкие погибают после действия отрицательных температур, сопровождающихся льдообразованием; морозостойкие выживают после действия отрицательной температуры и образования межклеточного льда.

Проблема устойчивости и закалывания морозостойких растений к отрицательным температурам изучена достаточно детально (Самыгин, 1974; Красавцев, 1986; Sakai, Larcher, 1987; Griffith, Yaish, 2004; Трунова, 2007; Венжик и др., 2012; Войников, 2013). Высокую чувствительность теплолюбивых растений к низким положительным температурам большинство авторов объясняют развитием окислительного стресса (ОС), приводящего к интенсификации перекисного окисления липидов (ПОЛ) и повреждению мембран (Prasad, 1996; Лукаткин, 2002; Марковская и др., 2010; Sochor et al, 2012; Иванов и др., 2014; Колупаев, 2016).

В отличие от групп теплолюбивых и морозостойких растений, физиологические и молекулярные основы низкотемпературного закалывания и устойчивости холодостойких растений, к которым относятся важнейшие продовольственные культуры, в том числе картофель, часто повреждающийся весенними заморозками, изучены в меньшей степени (Дроздов и др., 1984; Kikuchi et al., 2015). Показано, что холодостойкие растения обладают достаточно высокой **конститутивной** (т.е. в состоянии вегетации) устойчивостью к низкой положительной температуре и ОС (Palta et al., 1993; Дроздов, 2002; Демин и др., 2008), но остается открытым вопрос, повышается ли их **индуцибельная** (после закалывания) устойчивость. Кроме того, недостаточно исследованы причины, препятствующие развитию ОС, и механизмы формирования устойчивости к гипотермии у холодостойких растений.

Известно, что основной причиной повреждения растений при гипотермии являются нарушения структуры и функций клеточных мембран (Lyons, 1973; Красавцев, 1988). Одним из важнейших факторов стабилизации мембран при низкотемпературном закалывании, является изменение содержания жирных кислот (ЖК) мембранных липидов, связанное с накоплением полиненасыщенных ЖК (ПНЖК), которое регулируется активностью ферментов – десатураз (Murata, Wada, 1995; O'Quin et al.,

2010). Участие десатураз в адаптации к низким температурам подробно изучено на цианобактериях, при этом показано, что  $\Delta 12$ -десатураза, участвующая в образовании второй двойной связи в ацильных цепях ЖК, является критическим ферментом, необходимым для выживания клеток при низких температурах, а экспрессия гена *desA*, кодирующего  $\Delta 12$ -десатуразу, стимулируется низкими температурами и светом (Gombos, 1994; Mironov et al., 2012; Лось, 2014).

Изучение роли десатураз показало повышение конститутивной устойчивости картофеля к гипотермии при введении гена *desA*  $\Delta 12$ -десатуразы цианобактерий (Маали и др., 2005; Демин и др., 2008). Однако участие  $\Delta 12$ -десатуразы в процессе низкотемпературной адаптации холодостойких растений не изучалось, что подтверждает необходимость исследования роли этого фермента в формировании индуцибельной устойчивости.

**Цель и задачи исследования** заключались в изучении процессов закаливания холодостойких растений картофеля при длительном действии низких положительных температур и выявлении роли  $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы в этих процессах.

В соответствии с этим были поставлены следующие задачи:

1. Подтвердить наличие и экспрессию введенного гена *desA*  $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы из *Synechocystis sp.* PCC 6803 и изменения содержания и состава ЖК в листьях растений картофеля под влиянием трансформации.
2. Исследовать в процессе длительного низкотемпературного закаливания растений картофеля изменения:
  - уровня индуцибельной устойчивости;
  - состава и содержания ЖК мембранных липидов;
  - ультраструктурной организации хлоропластов;
  - содержания основных моно- и дисахаров (глюкозы, фруктозы и сахарозы);
  - интенсивности ПОЛ (по содержанию малонового диальдегида);
  - содержания пероксида водорода ( $H_2O_2$ ) и активности изоформ антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и пероксидаз).
3. Изучить влияние экспрессии гена *desA*  $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы на процессы низкотемпературного закаливания и изменение холодостойкости трансформантов.

**Научная новизна.** Впервые проведено комплексное исследование основных физиолого-биохимических процессов, участвующих в низкотемпературном закаливании холодостойких растений картофеля. Показано, что в процессе закаливания происходило повышение устойчивости картофеля к последующим заморозкам за счет существенного увеличения общего содержания ЖК мембранных липидов (в том числе повышения содержания линолевой (18:2), линоленовой (18:3) и гексадекатриеновой (16:3) ЖК), что соответствовало увеличению числа тилакоидных мембран хлоропластов. Исследование развития ОС и активности антиоксидантных ферментов выявило поддержание их равновесия в динамике низкотемпературного закаливания. При этом повышение общей активности СОД происходит в результате активации Cu/Zn-СОД и двух изоформ Fe-СОД. Образующийся пероксид водорода нейтрализуется в основном растворимыми гваяколовыми пероксидазами. Впервые

показано, что общая активность каталазы при низкотемпературном закаливании картофеля повышается за счет изоформы КАТ1.

Впервые изучено участие  $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы из *Synechocystis* в процессе низкотемпературного закаливания холодостойких растений к гипотермии. Трансформанты отличались от контроля повышенной устойчивостью к отрицательной температуре в результате увеличения содержания триеновых (18:3 и 16:3) ЖК, числа тилакоидных мембран хлоропластов, а также повышенной скорости накопления сахаров и меньшей интенсивности ОС за счет большей активности антиоксидантных ферментов.

**Практическая значимость.** Результаты диссертационной работы способствуют углублению и расширению знаний механизмов адаптации холодостойких растений картофеля к гипотермии, в частности, пониманию роли  $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы в этом процессе. Выявлено влияние повышения содержания ЖК мембранных липидов на интенсивность окислительных процессов, и их косвенное воздействие на активность антиоксидантных ферментов. Полученные данные могут быть использованы в селекции для определения адаптивного потенциала холодостойких растений, а теоретические обобщения в лекциях ВУЗов.

**Степень достоверности работы.** При выполнении работы использовались современные, проверенные во многих работах физиологические, биохимические и биофизические методы исследования. Эксперименты проводились в достаточных биологических повторностях. Выводы обоснованы экспериментальными данными и отражены в печатных работах. Достоверность полученных результатов обеспечена тщательным учетом и подробной оценкой результатов с использованием адекватных методов статистической обработки данных.

**Апробация результатов.** Основные результаты диссертационной работы докладывались на 14-ой Международной конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2010), Всероссийской конференции «Актуальные проблемы биологии и экологии» (Сыктывкар, 2010), Международной научной конференции «Биотехнология начала III тысячелетия» (Саранск, 2010), Всероссийском симпозиуме «Растение и стресс» (Москва, 2010), VII-ом Съезде общества Физиологов растений «Физиология растений - фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» (Н. Новгород, 2011), VII-ой Международной научной конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений» (Минск, 2011), VI-ом Всероссийском симпозиуме «Трансгенные растения» (Москва, 2016).

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Холодостойкие растения картофеля в результате низкотемпературного закаливания способны повышать индуцибельную устойчивость к отрицательной температуре.
2. Причинами отсутствия ПОЛ при гипотермии холодостойких растений являются, с одной стороны, высокая устойчивость мембран (за счет большего содержания ПНЖК), а, с другой стороны, сбалансированность окислительных процессов с активностью антиоксидантных ферментов.

3. Повышение общей активности СОД в процессе закаливания холодостойких растений происходит за счет активации изоформ Fe-СОД и Cu/Zn-СОД, а общей активности каталазы – в результате активации изоформы КАТ1. Активность пероксидазы гваякола вносит основной вклад в расщепление  $H_2O_2$ .

4. Причинами более высокой устойчивости трансформантов картофеля после закаливания являются: повышенное содержание триеновых (18:3 и 16:3) ЖК; более высокая скорость накопления сахаров и низкая интенсивность окислительных процессов в результате как предотвращения образования АФК, так и повышения активности антиоксидантных ферментов.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 20 работ, из которых 5 – в рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК.

**Структура диссертации.** Работа изложена на 127 страницах машинописного текста, содержит 9 таблиц, 19 рисунков и состоит из разделов: Введение, Обзор литературы, Объекты и методы исследования, Результаты и их обсуждение, Заключение, Выводы, Список использованной литературы. Список литературы включает 250 наименований, из них 166 на иностранных языках. Работа поддержана РФФИ (проект №11-04-00719, №16-34-01378).

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### ГЛАВА 1. Обзор литературы

В обзоре рассматриваются механизмы повреждения различающихся по устойчивости групп растений, в том числе ОС и ПОЛ, а также основные процессы, способствующие закаливанию растений к действию низких температур. При этом особое внимание уделено модификации структуры клеток, перестройке липидного и углеводного метаболизма, а также изменениям активности антиоксидантных ферментов и роли десатураз в формировании низкотемпературной устойчивости.

### ГЛАВА 2. Объекты и методы исследования

**Объектом исследования** служили нетрансформированные растения картофеля *Solanum tuberosum* L. сорта Десница (контроль) и трансформированные геном *desA*  $\Delta$ 12-ацил-липидной десатуразы цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803, линия 3, которая была выбрана согласно литературным данным (Маали др., 2006; Демин и др., 2008). В данной конструкции последовательность гена десатуразы была трансляционно слита с последовательностью репортерного гена *licBM3*, кодирующего термостабильную лихеназу (*desA-licBM3* растения). Конструкция гибридных генов находилась под контролем сильного конститутивного промотора 35S CaMV. Трансформанты также содержали маркерный ген устойчивости к канамицину *nptII*. Выражаем глубокую благодарность сотрудникам отдела биологии клетки и биотехнологии ИФР РАН за предоставленные растения.

Растения размножали черенкованием и выращивали на нейтральном минеральном субстрате (перлит) с регулярной подкормкой удобрением «Кемира-Люкс» в камере фитотрона ИФР РАН при температуре  $22\pm 0,5^\circ\text{C}$ , 16-часовом фотопериоде и освещенности 100 мкмоль квантов/( $\text{м}^2\cdot\text{с}$ ) в течение 8 недель. Закаливание растений проводили 6 сут. при  $5\pm 0,5^\circ\text{C}$  на свету 50 мкмоль квантов/( $\text{м}^2\cdot\text{с}$ ), с регулярным поливом. Холодостойкость определяли методом прямого промораживания интактных растений и по выходу электролитов из тканей (Herburn et al., 1986). Материалом для работы служили листья из средней части растений. Выделение ДНК проводили СТАВ-методом (Doyle et al., 1991). Специфические праймеры для проведения ПЦР конструировали с использованием базы данных NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) и online-ресурса Primer3 Plus. Фермент Hot Start Taq-полимеразу и буфер для этого фермента использовали фирмы «Fermentas». РНК выделяли с помощью набора Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma, США) и соответствующего протокола. Реакцию обратной транскрипции проводили, используя набор реагентов и протокол «RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit» фирмы «Fermentas». Анализ методом ОТ-ПЦР проводили согласно рекомендации «Fermentas». Определение содержания состава ЖК липидов проводили методом газожидкостной хроматографии (Цыдендамбаев, Верещагин, 1980; Пчелкин и др., 2001). Содержание глюкозы определяли глюкозооксидазным методом, сахарозу и фруктозу – по методу Roe et al. (Туркина, Соколова, 1971). Содержание пероксида водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) измеряли согласно методу (Kumar, Knowles, 1993). Об интенсивности ПОЛ судили по содержанию конъюгированных диенов (КД) и малонового диальдегида (МДА). Содержание КД определяли по методу (Bligh, Dyer, 1959; Biddlack, Tappel, 1973; Кейтс, 1975), а МДА – по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (Жиров и др., 1982). Общую активность СОД определяли по методике (Kumar, Knowles, 1993; Fridovich, 1986). Общую активность каталазы измеряли согласно методике (Kumar, Knowles, 1993). Активность растворимых пероксидаз гваякола определяли по модифицированному методу (Kumar, Knowles, 1993). Активность пероксидазы аскорбата определяли по модифицированному методу (Nakano, Asada, 1981). Выделение растворимых белков проводили при  $4^\circ\text{C}$  с помощью 50 мМ Трис-НСl (рН 7,6), который содержал 3 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 3 мМ ЭДТА, 2 мМ ДТТ, 1 мМ ФМСФ, 5 мМ аскорбиновую кислоту, 250 мМ сахарозу и 3,6 мМ цистеин. Растворимые белки очищали в 50 мМ Трис-НСl (рН 7,6) гель-фильтрацией в колонках PD midiTrap G-25 (GE Healthcare Life Science). Содержание белка определяли с бичинхониновым реагентом (Bicinchoninic Acid Kit, Sigma). Электрофорез белковой фракции для определения активности изоформ СОД в нативных условиях осуществляли в 15% ПААГ, а каталазы – в 10% ПААГ, по методике (Ornstein, Davis, 1964). Ингибиторный анализ для определения типа изоформ СОД проводили с помощью 3мМ KCN или 5мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Blokchina et al., 2003). Гель окрашивали по методике (Miszalski, et.al., 1998). Определение изоферментного спектра и активности каталазы проводили с помощью специфического окрашивания в 1% растворе ферроцианата калия ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) и 1%

FeCl<sub>3</sub> (Chandlee, Scandalios, 1984). Ультраструктуру хлоропластов исследовали с помощью электронной микроскопии и морфометрии (Sabatini et al., 1963).

Данные обработаны статистически с использованием программы «Т-test» и графопостроителя «SigmaPlot V.12.5» со встроенным статистическим анализом и One-Dscan V.1.3 (Scanalytics). Представлены средние арифметические значения из трех биологических повторностей и их стандартные ошибки. Обсуждаются различия, достоверные при 95%-ном уровне значимости (Доспехов, 1977).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### I. Молекулярно-биологический анализ растений.

В начале экспериментальной работы в *desA-licBM3* растениях было подтверждено наличие и экспрессия гена *desA*  $\Delta$ 12-ацил-липидной десатуразы цианобактерии, соответственно методами ПЦР-анализа (рис. 1а. (трек 3)) и ОТ-ПЦР (рис. 1 б. (трек 3)), т.е. по образованию мРНК (Demin, Naraykina et al., 2011).

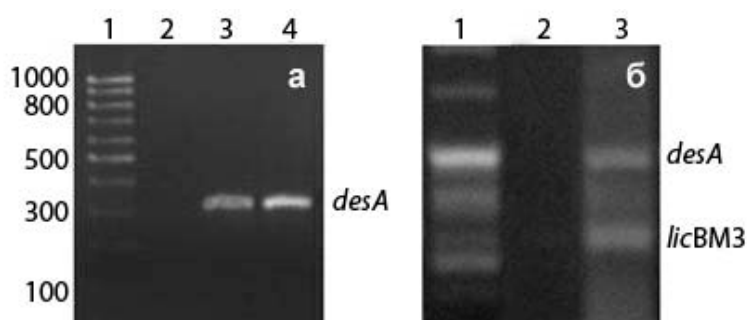


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР (а) и ОТ-ПЦР (б) контрольных и *desA-licBM3* растений картофеля: 1. нуклеотидные маркеры; 2. контрольные растения; 3. *desA-licBM3* растения; 4. положительный контроль (ДНК *Synechocystis*).

содержание линоленовой (18:3) ЖК, а гексадекатриеновой (16:3) ЖК – на 65%. На основании полученных данных можно предположить, что  $\Delta$ 12-десатураза цианобактерий в трансформантах картофеля использует в качестве субстрата не только С<sub>18</sub>-, но и С<sub>16</sub>-ЖК (данные представлены в диссертации).

Определение **конститутивной** устойчивости контрольных и *desA-licBM3* растений картофеля к гипотермии (минус 2±0,5°С, 6 ч), проведенное методом прямого промораживания, подтвердило ее повышение (данные представлены в диссертации), выявленное ранее (Маали и др., 2007; Демин и др., 2008).

Кроме того, экспрессия гена была также подтверждена достоверным повышением у *desA-licBM3* растений общего содержания ЖК, в том числе и ПНЖК мембранных липидов ~ на 30 % (Демин, Нарайкина и др., 2013). При этом, содержание целевой линолевой (18:2) ЖК, образованию которой способствовала введенная  $\Delta$ 12 - десатураза, увеличилось на 25%, настолько же повысилось



## II. Исследование влияния процессов длительного низкотемпературного закаливания холодостойких растений картофеля на устойчивость к гипотермии.

### 1. Индуцируемые низкой закаливающей температурой изменения устойчивости к гипотермии контрольных и *desA-licBM3* растений картофеля.

Прежде чем приступить к выполнению основных задач экспериментальной работы, необходимо было выявить изменения в устойчивости контрольных и трансформированных растений картофеля в процессе длительного низкотемпературного закаливания, которое проводили при 5°C в течение 6 суток, согласно методике (Синькевич, Нарайкина и др., 2011). Чтобы убедиться в том, что температура 5°C действительно является закаливающей и не вызывает повреждений, был проведен анализ динамики выхода электролитов из листьев при воздействии данной температуры. Известно, что у холодостойких растений низкие положительные температуры не вызывают визуально регистрируемых повреждений. Поэтому, чтобы выявить у них изменения в устойчивости в процессе закаливания, был применен метод прямого кратковременного воздействия отрицательными температурами, которые не вызывали бы гибели растений, но приводили к повреждениям, степень которых определяли по выходу электролитов из тканей листьев. Установлено, что 20-минутная обработка растений при минус  $7\pm 0,5^\circ\text{C}$  была оптимальной для выявления изменения

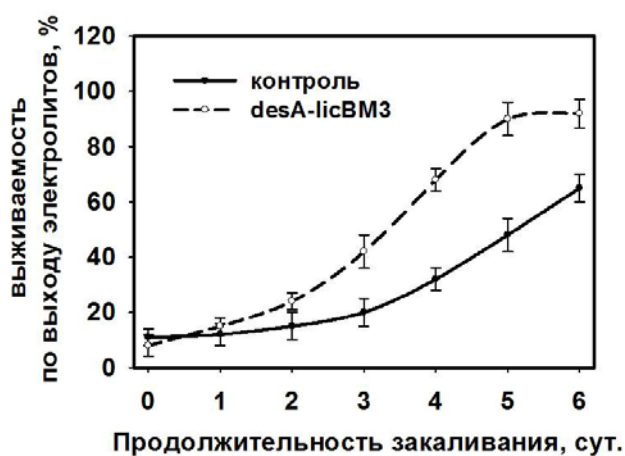


Рис. 2. Изменения устойчивости в динамике закаливания контрольных и *desA-licBM3* растений картофеля после минус  $7\pm 0,5^\circ\text{C}$ , 20 мин (% выживаемости – величина, обратная выходу электролитов).

устойчивости растений при закаливании. С использованием такого режима было показано, что устойчивость, как у контрольных, так и *desA-licBM3* растений во время закаливания она постепенно повышалась, причем у последних она была выше (рис. 2). Полученные данные свидетельствуют о способности картофеля закаливаться к воздействию более низких температур, причем *desA-licBM3* растения закаливались быстрее и эффективнее.

Для выявления различий в степени устойчивости растений к гипотермии после закаливания, был применен метод длительного воздействия более жестких отрицательных температур. Растения промораживали при минус  $3\pm 0,5^\circ\text{C}$  в течение 18 ч (рис. 3). Незакаленные растения обеих линий погибали, а закаленные трансформанты повреждались меньше, чем контрольные растения, что было подтверждено по выходу электролитов: выживаемость закаленных *desA-licBM3* растений составляла ~ 55%, а контрольных растений – 35%.

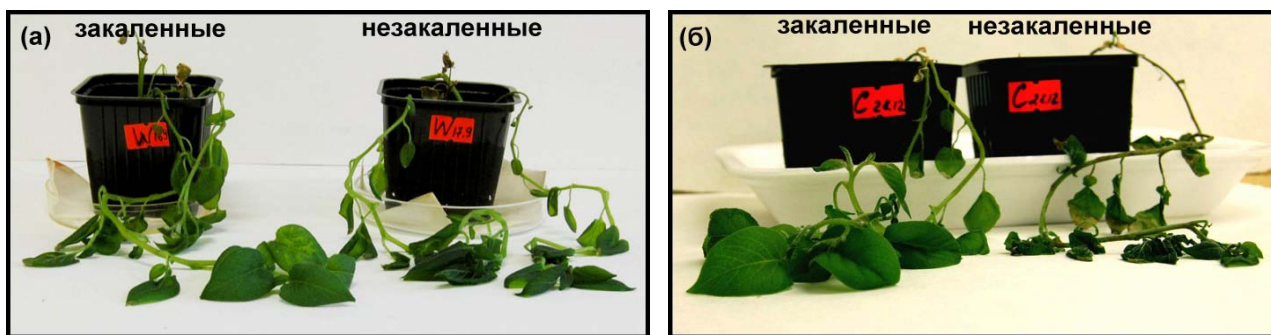


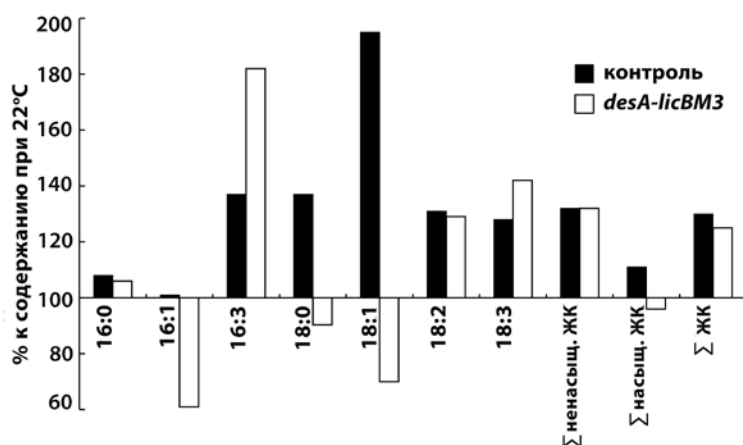
Рис. 3. Индуцибельная устойчивость закаленных и незакаленных контрольных (а) и *desA-licBM3* (б) растений картофеля после промораживания при минус  $3\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , 18 ч.

Сравнивая данные по конститутивной и индуцибельной устойчивости можно сделать вывод, что холодостойкие растения картофеля в результате длительного низкотемпературного закаливания повышают устойчивость к отрицательным температурам с минус  $2^{\circ}\text{C}$  до минус  $3^{\circ}\text{C}$  и обладают способностью выдерживать эту температуру более длительное время, по-видимому, за счет переохлаждения клеток.

## 2. Изменения в содержании и составе ЖК мембранных липидов в листьях при закаливании контрольных и *desA-licBM3* растений картофеля.

Выявив **индукцию** устойчивости к гипотермии в процессе низкотемпературного закаливания, необходимо было исследовать изменения в составе и содержании ЖК мембранных липидов в процессе закаливания растений картофеля.

Как показано на рис. 4, в процессе закаливания контрольных растений происходило достоверное повышение содержания общей суммы ЖК почти на 30% (за 100% принимали содержание ЖК до закаливания). Эти изменения включали увеличение содержания как насыщенных (на 10%), так и ненасыщенных ЖК (на



30%), в том числе за счет повышения доли линолевой (18:2) ЖК и линоленовой (18:3) ЖК на 25% и 40%, соответственно. В сумме содержание этих ЖК составляло 65% от общей суммы ЖК, с преимущественным содержанием линоленовой ЖК. Содержание гексадекатриеновой (16:3) ЖК, находящейся, как известно, в больших количествах в липидах мембран хлоропластов (Верещагин, 2007), после закаливания повышалось

Рис. 4. Изменения содержания ЖК мембранных липидов у растений картофеля после действия закалывающей температуры  $5\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  в течение 6 сут., % к содержанию ЖК при  $22^{\circ}\text{C}$ .

почти на 40%. Результаты свидетельствуют, что мембраны клеток в результате закаливания обогащаются ЖК, в том числе и ПНЖК и, таким образом, адаптируются к условиям низких температур.

В листьях трансформантов в процессе закаливания также происходило повышение общей суммы ЖК на 25%. При этом, сумма ненасыщенных ЖК увеличивалась на 30%, а насыщенных ЖК – даже несколько снижалась. Содержание линолевой (18:2) ЖК у трансформанта возрастало на 30%, линоленовой (18:3) ЖК на – 40%, гексадекатриеновой (16:3) ЖК – на 80% (то есть в 2 раза больше, чем в контроле). Повышение содержания триеновых ЖК, вероятно, происходило в результате активации собственных  $\omega 3$ -десатураз картофеля, которой способствовало повышение содержания субстрата (т.е. линолевой (18:2) ЖК) в результате активности введенной десатуразы. Так, у проростков морозостойкой пшеницы в результате закаливания на свету всегда происходило повышение содержания линоленовой (18:3) ЖК (Новицкая, Суворова, 1994; Верещагин, 2007), что свидетельствует о ее важной роли в повышении устойчивости растений к низкой температуре. Уменьшение содержания мононенасыщенных (16:1 и 18:1) ЖК в процессе закаливания может свидетельствовать о том, что они используются введенной  $\Delta 12$ -десатуразой в качестве субстрата в результате снижения ее специфичности.

Таким образом, в процессе низкотемпературного закаливания в листьях картофеля происходит накопление ЖК мембранных липидов ~ на 25–30%. Важно отметить, что у контрольных растений, кроме накопления ПНЖК, также повышается содержание насыщенных ЖК, тогда как у *desA-licBM3* растений в большей степени накапливаются триеновые (16:3 и 18:3) ЖК. Этому, вероятно, способствует повышение количества субстрата, т.е. (18:2) ЖК, что свидетельствует о важной роли введенной  $\Delta 12$ -десатуразы для закаливания растений.

### **3. Изменения ультраструктурной организации хлоропластов контрольных и *desA-licBM3* растений картофеля в процессе закаливания к гипотермии.**

Сохранение способности к фотосинтезу при низкой температуре рассматривается как необходимое условие формирования устойчивости растений к холоду (Красавцев, 1988, Kratch, Wise, 2000; Креславский и др., 2007; Трунова, 2007), однако вопрос об адаптации ультраструктуры клеток в связи с изменением уровня липидного метаболизма при закаливании холодостойких растений остается всё ещё мало исследованным.

С помощью методов электронной микроскопии и морфометрии нами было показано, что в результате закаливания у контрольных растений, по сравнению с незакаленными, площадь среза хлоропласта и общая площадь крахмальных зерен, рассчитанная на 1 хлоропласт, снижались почти на 40%, тогда как общая площадь пластоглобул (площадь пластоглобулы × число пластоглобул в одном хлоропласте) и общее число тилакоидов (число гран × число тилакоидов в одном хлоропласте) повышались на 80 и 35%, соответственно (табл. 1).

Таблица 1. Изменения ультраструктурной организации хлоропластов контрольных и *desA-licBM3* растений картофеля после закаливания при  $5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , 6 сут.

Объект	Вариант опыта	Площадь хлоропласта (мкм <sup>2</sup> )	В одном хлоропласте		
			Общая площадь		Общее число тилакоидов
			Крахмальных зерен (мкм <sup>2</sup> )	Пластоглобул (мкм <sup>2</sup> )	
контроль	$22 \pm 0,5^\circ\text{C}$	$8,98 \pm 0,16$	$3,08 \pm 0,11$	$0,07 \pm 0,005$	$86 \pm 3,65$
<i>desA-licBM3</i>		$9,05 \pm 0,19$	$2,63 \pm 0,08$	$0,08 \pm 0,006$	$154 \pm 7,08$
контроль	$5 \pm 0,5^\circ\text{C}$	<b><math>6,98 \pm 0,23</math></b>	<b><math>1,91 \pm 0,05</math></b>	<b><math>0,15 \pm 0,008</math></b>	<b><math>112 \pm 6,23</math></b>
<i>desA-licBM3</i>		<b><math>6,04 \pm 0,30</math></b>	<b><math>2,71 \pm 0,07</math></b>	<b><math>0,14 \pm 0,014</math></b>	<b><math>152 \pm 6,76</math></b>

Трансформанты уже до закаливания достоверно отличались от контрольных растений почти вдвое большим числом тилакоидных мембран (Астахова, Демин, Нарайкина и др., 2011). После закаливания *desA-licBM3* растений существенных изменений в мембранной системе хлоропластов не выявлено, но общее число тилакоидов у них оставалось ~ на 35% выше, по сравнению с контролем. Общая площадь крахмальных зерен, рассчитанная на один хлоропласт, также была выше у трансформантов, т. е. они имели больше запасных углеводов к концу закаливания.

Таким образом, при закаливании холодостойких растений в ультраструктуре хлоропластов происходят изменения, способствующие повышению их устойчивости, при этом трансформанты уже до закаливания обладали некоторыми признаками закаленных растений, например, отличались большим числом тилакоидных мембран, что свидетельствует о важной роли липидного метаболизма и, вероятно, способствует поддержанию их функциональной активности уже в начале закаливания.

#### 4. Изменение содержания растворимых углеводов у контрольных и *desA-licBM3* растений картофеля в процессе закаливания к гипотермии.

О функциональной активности хлоропластов в процессе закаливания могут свидетельствовать данные по изменению содержания сахаров в листьях. Как видно из табл. 2, в период закаливания контрольных растений происходило постепенное по-

Таблица 2. Изменение содержания растворимых сахаров у контрольных и *desA-licBM3* растений картофеля в динамике закаливания при температуре  $5 \pm 0,5^\circ\text{C}$  в течение 6 сут., мг/г сырой массы.

Сахара	До закаливания	Длительность закаливания, сут.		
		1	3	6
<b>контрольные растения</b>				
Фруктоза	$0,20 \pm 0,10$	$0,50 \pm 0,10$	$4,68 \pm 0,32$	$8,73 \pm 0,84$
Глюкоза	$3,41 \pm 0,35$	$4,84 \pm 0,43$	$5,64 \pm 0,58$	$8,52 \pm 0,74$
Сахароза	$2,97 \pm 0,40$	$6,15 \pm 0,81$	$9,22 \pm 1,67$	$13,06 \pm 1,46$
Σ сахаров	$6,58 \pm 0,84$	$11,49 \pm 1,12$	$19,54 \pm 1,81$	$25,31 \pm 2,80$
<b><i>desA-licBM3</i> растения</b>				
Фруктоза	$1,05 \pm 0,30$	$2,7 \pm 0,54$	$1,35 \pm 0,26$	$6,43 \pm 0,83$
Глюкоза	$3,15 \pm 0,56$	$6,37 \pm 0,83$	$6,80 \pm 0,75$	$6,39 \pm 0,94$
Сахароза	$2,13 \pm 0,60$	$10,30 \pm 1,25$	$10,69 \pm 2,90$	$10,44 \pm 1,77$
Σ сахаров	$6,33 \pm 1,42$	$19,37 \pm 3,23$	$18,84 \pm 2,04$	$23,26 \pm 3,41$

вышение количества всех исследованных сахаров (сахарозы, глюкозы и фруктозы), сумма которых увеличилась более, чем в 3,5 раза.

Важно отметить, что у *desA-licBM3* растений уже в первые сутки закаливания наблюдали резкое повышение содержания сахаров (глюкозы – в 2 раза, сахарозы – в 5 раз) (табл. 2). Учитывая, что к окончанию закаливания исследуемые линии картофеля по сумме сахаров существенно не различались, необходимо отметить, что у *desA-licBM3* растений, по сравнению с контролем, повышение их содержания в период закаливания происходило гораздо быстрее.

### 5. Изменение показателей интенсивности окислительных процессов и активности антиоксидантных ферментов в динамике закаливания у контрольных и *desA-licBM3* растений.

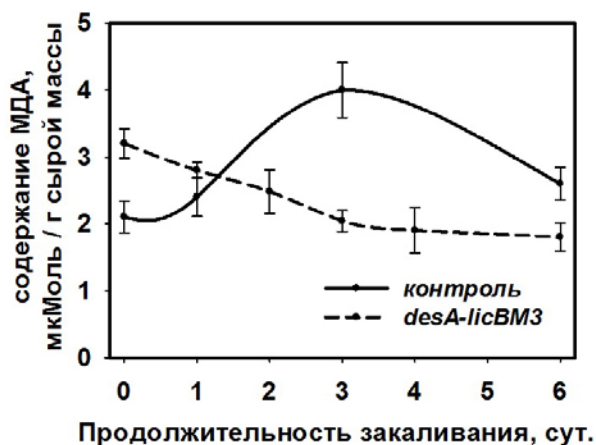


Рис. 5. Изменение содержания МДА у контрольных и *desA-licBM3* растений в динамике закаливания при  $5\pm 0,5^\circ\text{C}$  в течение 6 сут.

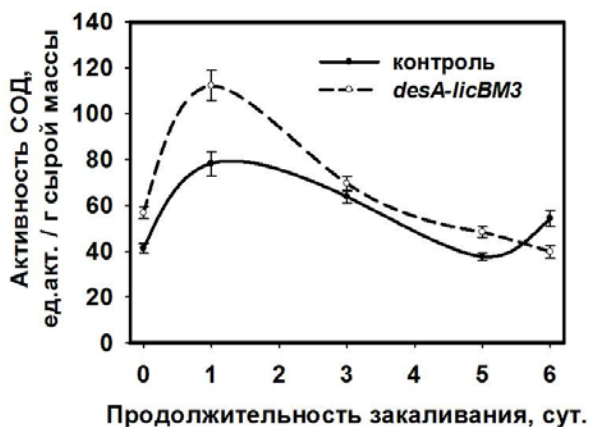


Рис. 6. Изменение общей активности СОД у контрольных и *desA-licBM3* растений картофеля в динамике закаливания при  $5\pm 0,5^\circ\text{C}$  в течение 6 сут.

Поскольку интенсивность ОС в значительной степени определяется устойчивостью мембран к низкой температуре, необходимо было проанализировать основные показатели ОС и ПОЛ в динамике закаливания растений. Как видно на рис. 5, во время закаливания контрольных растений содержание МДА – одного из конечных продуктов ПОЛ – сначала повышалось, но к концу закаливания снижалось практически до уровня незакаленных растений. Важно отметить, что у *desA-licBM3* растений в динамике закаливания наблюдали даже снижение этого показателя на 40%. Таким образом, в отличие от теплолюбивых растений, у холодостойких в результате закаливания не происходит активации процессов ПОЛ, что может быть связано с низкой генерацией АФК благодаря высокому содержанию ПНЖК мембранных липидов. С другой стороны, это может быть связано с активностью системы антиоксидантной защиты клеток.

Как известно, на ранних стадиях развития ОС, СОД играет ключевую роль в детоксикации супероксидного аниона. Образующийся при этом  $\text{H}_2\text{O}_2$  далее разлагается с помощью каталазы и пероксидаз. Эта тройка ферментов

составляет первичное звено защиты от АФК. Поэтому в динамике закаливания были исследованы изменения активностей всех компонентов этой схемы.

Как показано на рис. 6, в начале закаливания контрольных растений происходило почти двукратное увеличение общей активности СОД, что может свидетельствовать о повышенной скорости генерации супероксида в этот период (Нарайкина и др., 2014). К третьим суткам закаливания наблюдалось снижение активности фермента почти до уровня незакаленных растений. У трансформанта наблюдали в целом сходную динамику активности СОД, но, в отличие от контроля, с

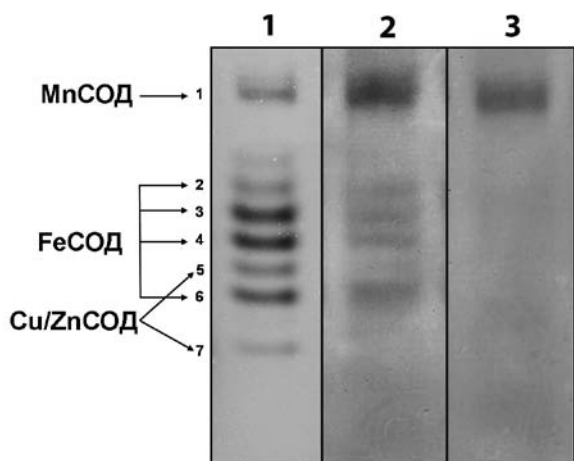


Рис. 7. Изоферментный состав СОД у вегетирующих растений картофеля (при  $22 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ).

- 1 – контроль, без ингибиторов;
- 2 – 5 мМ KCN;
- 3 – 3 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

большим повышением в начале закаливания, что может быть связано с повышенным содержанием у них ПНЖК мембранных липидов, которое, согласно (Asada, 1996), может влиять на скорость взаимодействия СОД с супероксидом. Поскольку в высших растениях присутствуют три типа СОД (Mn-, Fe- и Cu/Zn-СОД), различающиеся по своей активности в условиях действия низкотемпературного стрессора (Choi et al., 2002), в дальнейшей работе было важным исследовать их изоферментный состав и оценить вклад каждой изоформы в общую активность СОД в динамике закаливания.

На основании проведенного ингибиторного анализа и электрофоретического разделения белков (рис. 7) у обеих линий картофеля обнаружены одна Mn-СОД (полоса 1), устойчивая к  $\text{H}_2\text{O}_2$  и KCN, четыре изоформы Fe-СОД (полосы 2, 3, 4, 6), устойчивые к KCN, и две Cu/Zn-СОД (полосы 5, 7), неустойчивые к обоим ингибиторам. В процессе закаливания у исследуемых растений наблюдали изменения интенсивности

окрашивания всех выявленных изоформ СОД (рис. 8), что свидетельствует об изменении их активности.

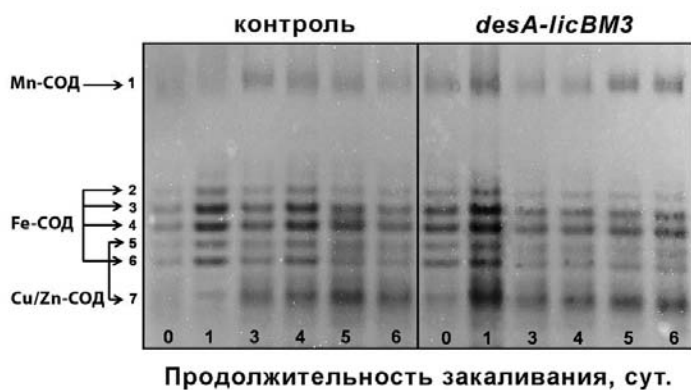


Рис. 8. Изменение активности изоформ СОД у контрольных и *desA-licBM3* растений картофеля в динамике закаливания.

Для количественного сравнения данных проводили оцифровку в программе One-Dscan V.1.3 (табл. 3, приведены данные типичного эксперимента). После первых суток закаливания у контрольных растений наблюдали повышение активности всех изоформ, при этом у трансформанта она была выше, например, активность

Таблица 3. Изменение активности изоферментов СОД в листьях контрольных (а) и *desA-licBM3* (б) растений картофеля во время закаливания (в усл. оптических ед.)

Изоферменты СОД	№ полосы на геле	Продолжительность закаливания, сут					
		0	1	3	4	5	6
Контрольные растения							
Mn-СОД	1	0,075	0,045	0,908	0,535	1,148	0,816
Fe-СОД	2	0,386	1,473	0,569	0,829	0,551	0,229
Fe-СОД	3	1,294	5,655	1,974	4,577	3,292	1,027
Fe-СОД	4	1,419	5,120	2,725	4,894	4,328	1,585
Cu/Zn-СОД	5	0,557	1,262	0,647	1,059	0,590	0,700
Fe-СОД	6	0,656	2,771	0,919	1,862	0,404	0,776
Cu/Zn-СОД	7	0,086	0,596	2,901	2,386	3,636	1,012
<i>desA-licBM3</i> растения							
Mn-СОД	1	1,193	2,943	0,994	0,297	3,143	0,347
Fe-СОД	2	0,743	1,402	0,295	0,523	0,576	0,505
Fe-СОД	3	3,401	7,780	0,879	1,486	2,054	2,254
Fe-СОД	4	3,797	9,840	1,685	2,188	3,373	3,449
Cu/Zn-СОД	5	1,098	2,070	0,194	0,328	0,404	0,502
Fe-СОД	6	1,836	3,441	0,494	0,702	0,690	0,537
Cu/Zn-СОД	7	1,092	11,165	2,163	2,836	4,487	1,497

изоформы Cu/Zn-СОД (полоса 7) повышалась, более чем на порядок (рис. 8). Известно, что эта изоформа, предположительно являясь цитозольной, наиболее чувствительна к избытку АФК (Zhang et al., 2009).

Кроме того, активность двух Fe-СОД, предположительно локализованных в хлоропластах, повышалась у контрольных растений ~ в 4 раза, а у трансформанта – в 2 раза по сравнению с показателями незакаленных растений; однако по абсолютным значениям она оставалась выше у *desA-licBM3* растений. К шестым суткам

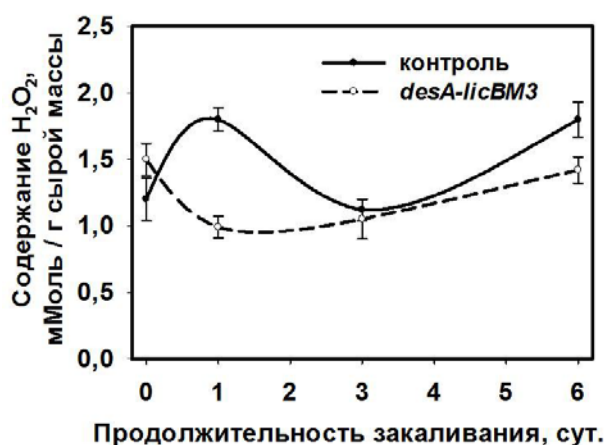


Рис. 9. Изменение содержания H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у контрольных и *desA-licBM3* растений в динамике закаливания при 5±0,5°С в течение 6 сут.

закаливания наблюдали снижение активности практически всех изоформ СОД у обеих линий (табл. 3), соответствовало снижению скорости генерации супероксида (Нарайкина и др., 2014). Можно предположить, что повышение активности цитозольных и хлоропластных СОД уже в первые сутки закаливания приводило к торможению развития окислительных процессов.

Учитывая, что в результате активности СОД образуется H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, мы исследовали его содержание в динамике закаливания картофеля (рис. 9). Выявлено,

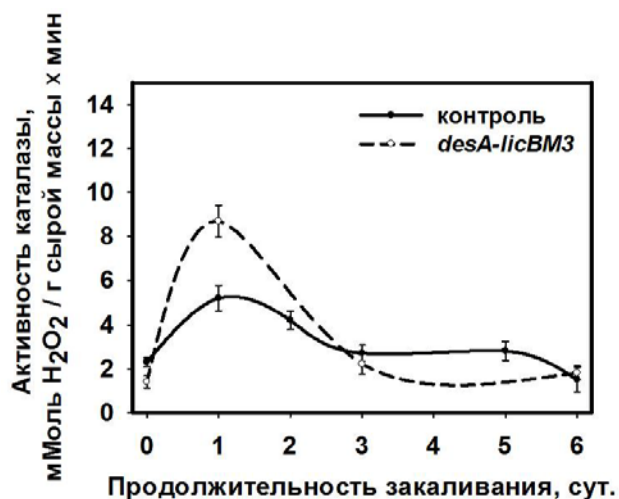


Рис. 10. Изменение общей активности каталазы у контрольных и *desA-licBM3* растений картофеля в динамике закаливания.

аскорбата и гваякола. У контрольных и *desA-licBM3* растений происходило повышение общей активности каталазы в начальный период закаливания в 2 и 4 раза, соответственно, с последующим снижением (рис. 10), что соответствовало изменениям содержания  $H_2O_2$ .

Поскольку у растений присутствуют несколько изоформ каталазы, важно было оценить вклад каждой в общую активность каталазы в динамике закаливания. Согласно электрофореграмме (рис. 11), в листьях исследуемых растений были обнаружены две полосы активности каталазы, различающиеся по молекулярной массе, кото-

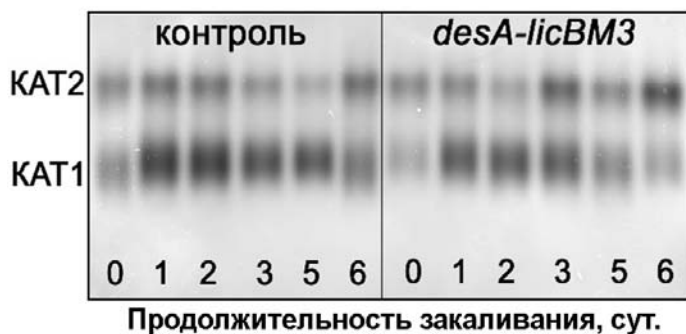


Рис. 11. Электрофореграмма активности изоформ каталазы KAT1 и KAT2 у контрольных и *desA-licBM3* растений картофеля в динамике закаливания при  $5 \pm 0,5^\circ C$ , 6 сут.

рые были предположительно отнесены к каталазам класса 1 и 2, в соответствии с данными литературы, согласно которым, в листьях табака и арабидопсиса ферменты класса 1 составляют большую часть активности каталазы (Mhamdi et al., 2010). Поэтому полосу с большей активностью можно предварительно отнести к каталазе класса 1 и условно обозначить ее как изоформа KAT1, а полосу с меньшей активностью можно принять за KAT2. Оцифровка дан-

ных в программе One-Dscan V.1.3 показала, что в процессе первых двух суток закаливания как контрольных, так и *desA-licBM3* растений активность изоформы KAT1 повышалась (рис. 12) и отличалась более высокой активностью в процессе закаливания по сравнению с KAT2 (данные представлены в диссертации).

На основании полученных данных можно сделать заключение, что утилизация  $H_2O_2$  у обеих линий во время закаливания осуществлялась с подавляющим участием

что у контрольных растений в начале закаливания содержание  $H_2O_2$  повышалось ~ на 50%, к третьим суткам оно заметно снижалось, а к шестым суткам снова возрастало. У *desA-licBM3* растений в начале закаливания наблюдали даже снижение количества  $H_2O_2$  почти на 70%, а к шестым суткам оно несколько увеличилось, по сравнению с незакаленными растениями.

В связи с тем, что содержание  $H_2O_2$  зависит и от ферментов, разлагающих  $H_2O_2$ , в процессе закаливания была изучена динамика активности этих ферментов, прежде всего каталазы, пероксидазы



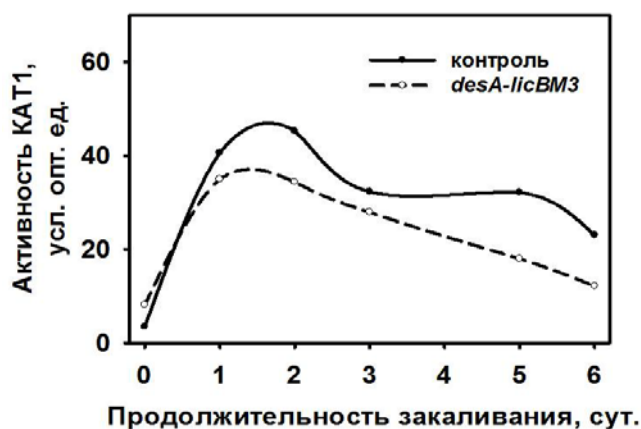


Рис. 12. Изменения активности изоформы КАТ1 у контрольных и *desA-licBM3* растений картофеля в динамике закаливания (в усл. опт. ед.).

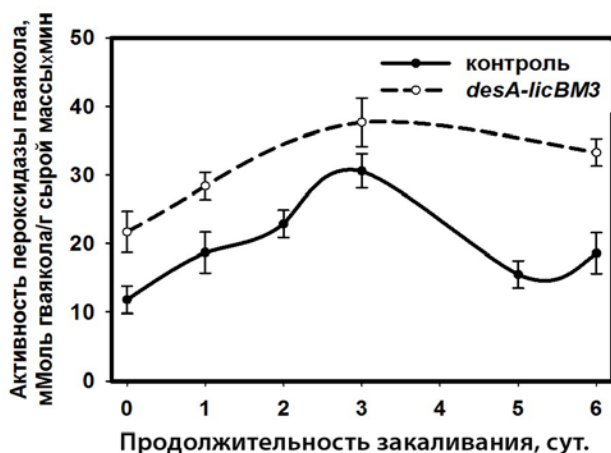


Рис. 13. Изменение суммарной активности пероксидазы гваяколовых пероксидаз у контрольных и *desA-licBM3* растений картофеля в динамике закаливания.

изоформы КАТ1, а ее повышенная активность у контрольных растений во время закаливания соответствовала большому содержанию  $H_2O_2$  у этих растений. Это подтверждается данными литературы, согласно которым обработка срезанных листьев арабидопсиса 10 мМ  $H_2O_2$  вызывала увеличение активности каталазы (Rao et al., 1997).

Как показали данные (рис. 13), наиболее активным ферментом, расщепляющим  $H_2O_2$  при закаливании контрольных и трансформированных растений, являлась пероксидаза гваякола. Суммарная активность растворимых гваяколовых пероксидаз (рис. 13) у контроля максимально повышалась к третьим суткам закаливания, когда активность каталазы уже снижалась. У *desA-licBM3* растений она была выше, по сравнению с контролем, и оставалась повышенной в процессе закаливания, что может свидетельствовать о разной локализации образующегося  $H_2O_2$  у контрольных и *desA-licBM3* растений.

Вклад активности пероксидазы аскорбата в расщепление  $H_2O_2$  во время закаливания растений картофеля, по сравнению с каталазой, был незначительным (данные представлены в диссертации).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Группа холодостойких растений, типичным представителем которых является картофель, по уровню устойчивости к гипотермии занимает промежуточное положение между теплолюбивыми и морозостойкими растениями, отличаясь от первых более высокой устойчивостью к низким положительным температурам, а от вторых — отсутствием механизма формирования свойства морозостойкости, то есть устойчивости к образующемуся при отрицательных температурах льду. В силу многих причин, основы закаливания этой группы к более низким температурам, например, к заморозкам, недостаточно изучены.

Использование модифицированного нами комбинированного метода прямого краткосрочного воздействия отрицательной температуры позволило выявить различия в устойчивости между незакаленными и закаленными растениями картофеля. Таким образом, была доказана способность холодостойких растений в процессе низкотемпературного закаливания повышать устойчивость к отрицательным температурам с минус 2°C до минус 3°C и выдерживать эту температуру более длительное время за счет переохлаждения клеток. Такое свойство холодостойких растений, к которым, кроме картофеля, относятся многие продовольственные культуры, является чрезвычайно важным, поскольку в ранний период развития они часто повреждаются под действием заморозков. При этом следует отметить, что эти растения не формируют механизм устойчивости к образующемуся при отрицательной температуре льду.

Исследования в динамике закаливания растений картофеля к заморозкам основных физиолого-биохимических процессов позволили выявить ряд существенных особенностей, отличающих их от других групп. Прежде всего, в отличие от теплолюбивых, у холодостойких растений при длительном действии низких закаливающих температур не наблюдается развития ОС и интенсификации процессов ПОЛ. Как показывают наши результаты, этому препятствует накопление в листьях мембранных липидов с высоким содержанием ПНЖК, особенно линолевой (18:2), линоленовой (18:3) и гексадекатриеновой (16:3) ЖК, которые после закаливания составляют более 65% от суммы всех ЖК. Это обеспечивает сохранение текучести мембран и их функциональной активности при длительном действии пониженных температур, а также стабилизацию работы ЭТЦ, снижение генерации АФК и предотвращение интенсификации процессов ПОЛ. Ведущая роль липидов и активности десатураз в формировании холодостойкости растений получила подтверждение в наших экспериментах с закаливанием растений картофеля, трансформированных геном *desA*, кодирующего  $\Delta 12$ -ацил-липидную десатуразу цианобактерий. Эти растения, по сравнению с контролем, обогащены ЖК мембранных липидов, в том числе ПНЖК, что дает им существенное преимущество в реализации всех процессов закаливания и формировании более высокой устойчивости к действию низких повреждающих температур. Поддержание жидкостных свойств мембран при низких закаливающих температурах опосредованно способствует повышению активности исследованных антиоксидантных ферментов (Asada, 1996). Выявлено, что в процессе закаливания наибольшей активностью отличались локализуемые в хлоропластах две изоформы СОД и находящаяся в цитозоле Cu/Zn-СОД.

Среди ферментов, снижающих содержание  $H_2O_2$ , высокой активностью в динамике закаливания отличались растворимые гваяколовые пероксидазы. Менее активной была выявленная нами у картофеля одна из изоформ каталазы – КАТ1, однако ее роль при низкотемпературном закаливании растений весьма существенна, поскольку каталаза разлагает пероксид водорода энергосберегающим способом, сохраняя энергию для синтеза необходимых при закаливании белков и липидов.

Известно, что в формировании устойчивости растений к гипотермии большую роль играет накопление сахаров. Наиболее высокое содержание сахаров (до 40% от сух. массы) накапливается при закаливании морозостойких растений, что является одним из важнейших факторов адаптации к низким отрицательным температурам, сопровождающимся образованием внеклеточного льда. Как показали наши исследования, при закаливании холодостойких растений картофеля максимум накопления сахаров составляет около 4% от сух. массы, что, по-видимому, является недостаточным для формирования их устойчивости к замораживанию и, таким образом, существенным отличием их от морозостойких растений. Однако, у растений картофеля происходило повышение содержание сахаров в процессе закаливания, достаточное для снижения точки замерзания растворов в условиях заморозка, выполнения осморегуляторной, мембранопротекторной, антиоксидантной, энергетической и других функций. Но такое повышение недостаточно для предотвращения льдообразования внутри клеток и формирования устойчивости к обезвоживанию образующимся внеклеточным льдом.

## ВЫВОДЫ

1. Холодостойкие растения картофеля в результате длительного низкотемпературного закаливания способны повышать индуцибельную устойчивость к длительному действию заморозков.
2. Низкотемпературное закаливание растений картофеля не приводит к существенным изменениям количества АФК и продуктов ПОЛ, что связано с повышением общего содержания ЖК мембранных липидов и входящих в их состав ПНЖК, увеличением числа тилакоидных мембран хлоропластов и содержания сахаров, а также активности антиоксидантных ферментов.
3. У растений картофеля выявлено 7 изоформ СОД: одна Mn-СОД, четыре Fe-СОД и две Cu/Zn-СОД. Показано, что при закаливании происходит повышение активности Cu/Zn-СОД и двух Fe-СОД, что, вероятно, обуславливало сохранение прооксидантно-оксидантного равновесия в клетке.
4. Образующийся в период закаливания растений  $H_2O_2$  нейтрализуется преимущественно пероксидазами гваякола, активность которых поддерживалась на более высоком уровне по сравнению с каталазой и пероксидазой аскорбата. Из выявленных нами двух изоформ каталазы высокой активностью во время закаливания отличалась изоформа КАТ1.
5. Закаливание растений картофеля, трансформированных геном *desA*  $\Delta$ 12-ацил-липидной десатуразы цианобактерий, приводит к повышению устойчивости к отрицательным температурам с минус 2°C до минус 3°C за счет увеличения времени переохлаждения клеток. Трансформанты отличаются от контроля высокой скоростью накопления сахаров, более низким содержанием  $H_2O_2$  и МДА, повышенной активностью антиоксидантных ферментов, и существенным повышением содержания

триеновых ЖК, которые наиболее эффективно снижают температуру фазового перехода липидов.

### Список публикаций по теме диссертации

#### Статьи в журналах перечня ВАК:

1. Астахова Н.В., Дёмин И.Н., Нарайкина Н.В., Трунова Т.И. Влияние гена *desA*  $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы на структуру хлоропластов картофеля, в связи с устойчивостью к гипотермии // Физиология растений. 2011. Т. 58. С. 21–27.
2. Демин И.Н., Нарайкина Н.В., Цыденданбаев В.Д., Мошков И.Е., Трунова Т.И. Введение гена *desA*  $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы цианобактерии повышает устойчивость картофеля к окислительному стрессу, индуцированному паракватом // Физиология растений. 2011. Т. 58. С. 574–581.
3. Синькевич М.С., Нарайкина Н.В., Трунова Т.И. Процессы, препятствующие повышению перекисного окисления липидов у холодостойких растений при гипотермии // Физиология растений. 2011. Т. 58. С. 875–882.
4. Демин И.Н., Нарайкина Н.В., Цыдендамбаев В.Д., Мошков И.Е., Трунова Т.И. Влияние трансформации растений картофеля геном  $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы на  $\text{CO}_2$ -газообмен и активность антиоксидантных ферментов при гипотермии // Физиология растений. 2013. Т. 60. С. 377–385.
5. Нарайкина Н.В., Синькевич М.С., Дёмин И.Н., Селиванов А.А., Мошков И.Е., Трунова Т.И. Изменения активности изоформ супероксиддисмутазы у растений картофеля дикого типа и трансформированных геном  $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы при низкотемпературной адаптации // Физиология растений. 2014. Т. 61. С. 359–366.

#### Тезисы и материалы конференций:

6. Нарайкина Н.В., Демин И.Н. Участие  $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы в формировании устойчивости картофеля к гипотермии. Мат. XVII Всеросс. научн. конф. «Актуальные проблемы биологии и экологии», Сыктывкар, 2010. С. 241–244.
7. Синькевич М.С., Нарайкина Н.В., Трунова Т.И. Адаптация холодостойких растений к гипотермии на примере различающихся по устойчивости сортов картофеля. Мат. научн. конф., Саранск, 2010. 96 с.
8. Демин И.Н., Нарайкина Н.В. Трансформированные растения как модель изучения роли десатураз в формировании холодостойкости растений. III Всеросс. конф. «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира», Волгоград, 2010. С. 47–52.
9. Нарайкина Н.В., Дёмин И.Н., Синькевич М.С. Влияние пониженной температуры на интенсивность перекисного окисления липидов у растений картофеля. Сб. тезисов XIV междунар. школы-конференции "Биология – наука XXI века", Пущино, 2010. Т. 2. с. 330.
10. Синькевич М.С., Нарайкина Н.В., Трунова Т.И. Генерация супероксидного аниона после охлаждения растений картофеля. Сб. тезисов XIV международной школы-

конференции молодых ученых "Биология – наука XXI века", Пущино, 2010. Т. 2. с. 337.

**11.** Синькевич М.С., Нарайкина Н.В., Трунова Т.И. Изменение активности антиоксидантных ферментов при адаптации растений картофеля к гипотермии. Сб. тез. XIV междунар. школы-конференции "Биология – наука XXI века", 2010. Т. 2. С. 337–338.

**12.** Синькевич М.С., Нарайкина Н.В., Трунова Т.И. Генерация супероксид аниона после охлаждения растений картофеля с измененным углеводным и липидным метаболизмом. Сб. тез. междунар. науч. конф. «Биотехнология начала III тысячелетия», Саранск, 2010. с. 90.

**13.** Астахова Н.В., Демин И.Н., Нарайкина Н.В., Трунова Т.И. Изменение структурной организации хлоропластов и устойчивость к гипотермии растений картофеля под влиянием трансформации геном *desA*  $\Delta$ 12-ацил-липидной десатуразы цианобактерии *Synechocystis* sp. Сб. тезисов Всеросс. симпозиума «Растение и стресс». Москва: ИФР РАН, 2011. с. 40.

**14.** Синькевич М.С., Нарайкина Н.В., Трунова Т.И. Сахара в системе антиоксидантной защиты от индуцированного паракватом окислительного стресса. Сб. тезисов Всеросс. симпозиума «Растение и стресс». Москва: ИФР РАН, 2011. С. 323–324.

**15.** Нарайкина Н.В., Демин И.Н., Астахова Н.В., Трунова Т.И. Изменение интенсивности перекисного окисления липидов у картофеля при низкотемпературной адаптации. Сб. мат. X Междунар. конф. «Интродукция нетрадиционных и редких растений», Ульяновск, 2012. С. 285–291.

**16.** Демин И.Н., Нарайкина Н.В., Суворова Т.А., Трунова Т.И. Участие линолевой жирной кислоты в регуляции свободно-радикальных процессов у картофеля. Сб. мат. X Междунар. конф. «Интродукция нетрадиционных и редких растений», Ульяновск, 2012. С. 197–205.

**17.** Демин И.Н., Нарайкина Н.В., Трунова Т.И. (2013) Участие  $\Delta$ 12-ацил-липидной десатуразы в защите от оксидативного стресса при обработке растений картофеля паракватом. Сб. мат. X Междунар. симп. «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования», Т. 1, Пущино, 2013. С. 91–95.

**18.** Нарайкина Н.В., Синькевич М.С., Трунова Т.И. Изменение активности различных типов супероксиддисмутазы в клетках листьев картофеля при длительной гипотермии. Мат. XVII Всеросс. научн. конф. «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий». Т. 2. Калининград, 2014 с. 321–322.

**19.** Нарайкина Н.В., Дерябин А.Н., Трунова Т.И. Оценка устойчивости холодостойких растений картофеля к гипотермии // Мат. Всеросс. науч. конф. «Факторы устойчивости растений и микроорганизмов в экстремальных природных условиях и техногенной среде», Иркутск, 2016. С.269–270.

**20.** Нарайкина Н.В., Астахова Н.В., Синькевич М.С., Трунова Т.И. Введение гена *desA* изменяет ультраструктуру хлоропластов и повышает устойчивость растений картофеля при закаливании к гипотермии. Мат. VI Всеросс. симпозиума «Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность». Москва: ИФР РАН, 2016. 239 с.