На правах рукописи

Миловская Ирина Георгиевна

Плазматическая мембрана как компонент первичного восприятия холодового стресса у растений томата

1.5.21. Физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Москва – 2026

Работа выполнена в лаборатории физиологических и молекулярных механизмов адаптации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук.

Научный руководитель:
кандидат биологических наук, **Пашковский Павел Павлович**

Официальные оппоненты:
Соловченко Алексей Евгеньевич – доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры биоинженерии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Медведев Сергей Семенович – доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры, заведующий кафедрой физиологии и биохимии растений биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Санкт-Петербургского государственного университета.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук (СИФИБР СО РАН).

Защита диссертации состоится 28.05.2026 в 15:00 на заседании диссертационного совета 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, Москва, Ботаническая ул., 35. Телефон: +7 (499) 678-54-00, электронная почта: ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук и на сайте www.ippras.ru

Автореферат разослан «_____» марта 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета:

кандидат биологических наук Иванова Александра Игоревна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Холодовой стресс является одним из основных абиотических факторов, ограничивающих рост, развитие и продуктивность сельскохозяйственных культур (Joshi et al., 2018). Он приводит к снижению всхожести, замедлению роста, нарушению репродуктивных процессов и значительным потерям урожая (Maleki et al., 2018). Отклонение температуры от оптимальных значений вызывает комплекс физиологических, биохимических и молекулярных нарушений, вплоть до гибели растений (цит. по Yadav et al., 2010; Maleki et al., 2018). В условиях реализации «Стратегии развития агропромышленного комплекса Российской Федерации» до 2030 года, предусматривающей расширение посевных площадей за счёт вовлечения неиспользуемых земель, особую актуальность приобретает создание холодоустойчивых сортов (https://sudact.ru/law/rasporiazhenie-pravitelstva-rf-ot-08092022-n-2567-r/). Это обусловлено климатическими особенностями значительной части территории России, характеризующейся низкими температурами. Для успешной реализации вышеуказанной цели, необходимо понимать механизмы, лежащие в основе ответа растения на холодовой стресс. Необходимо отметить, что низкотемпераутрный стресс подразделяют на стресс от низких положительных температур и стресс от отрицательных температур (Joshi et al., 2018). Два типа этих воздействий связаны между собой, но в данной работе пойдет речь только о механизмах сопротивляемости стрессу от низких положительных температур, который будем называть холодовым. В исследованиях ответа высших растений на низкие положительные температуры хорошо изучены молекулярные механизмы, включающие активацию транскрипционных факторов CBF (C-box binding factors) и экспрессию генов *COR (cold-responsive*), необходимых для запуска защитных реакций (Liu, et al., 2017, Shi et al., 2018). Вместе с тем начальные этапы, приводящие к активации этих молекулярных событий, изучены недостаточно. Устойчивость растений к холодовому стрессу связана прежде всего с состоянием клеточных мембран, повреждение которых приводит к нарушению фотосинтеза, дыхания и клеточного гомеостаза (Yadav et al., 2010). Ключевым параметром мембран является их текучесть, определяемая соотношением насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Снижение текучести при воздействии низких температур нарушает функционирование мембранных белков и ионный транспорт. Экспериментальные данные свидетельствуют о связи между текучестью мембран и холодоустойчивостью растений, включая влияние на Ca^{2+}-зависимую сигнализацию и экспрессию генов устойчивости к холоду (Sangwan et al., 2002; Orvar et al., 2000). Однако остаётся неясным, является ли процесс изменения текучести мембран частью первичного механизма восприятии холодового стресса или просто представляет собой один из множества адаптационных механизмов, происходящих в клетке в ответ на воздействие низких температур. Недостаточное понимание роли текучести плазматической мембраны в восприятии холодового стресса определяет актуальность дальнейших исследований в данной области. Примечательно, что для цианобактерий данный вопрос изучен значительно глубже. Для цианобактерий показано, что текучесть мембран выступает в роли первичного сенсора при восприятии пониженных температур. Снижение температуры приводит к более плотной упаковке мембранных липидов и, как следствие, к уменьшению текучести мембраны (Los et al., 2013). Повышение вязкости мембран влияет на конформационное состояние гистидинкиназы Hik33, что инициирует каскад фосфорилирования и последующую индукцию генов, обеспечивающих

холодоустойчивость (Los et al., 2013). Эти данные позволяют предположить, что изменение текучести мембран может выполнять аналогичную сигнальную функцию и у высших растений. Следует подчеркнуть, что наличие связи между текучестью мембраны и восприимчивостью к холодовому стрессу для высших растений доказано неоднократно, но не показано, что именно изменение состояния мембраны выступает в роли первичного сенсора пониженных температур. Таким образом, основная научная проблема состоит в недостаточном понимании механизмов восприятия холодового стресса высшими растениями и, в частности, в выяснении роли текучести мембран как возможного первичного сенсора низких температур**.**

Цель и задачи исследования.

Цель работы: выяснить возможную связь текучести плазматической мембраны с первичной чувствительностью высших растений (томата) к низкотемпературному стрессу.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1.1 Оценить степень повреждающего воздействия низкой положительной температуры (+6 °C) на растения *Solanum lycopersicum* (сортов LA3914 Micro-Tom и LA2706 MoneyMaker) и вида *Solanum lycopersicoides* LA2781 с помощью двух параметров - оценки степени утечки электролитов и оценки эффективного квантового выхода фотосистемы II (Y(II)).

1.2 Оценить уровень транскриптов генов *CBF* в качестве показателя восприимчивости растениями холодового стресса.

1.3 Оценить содержание различных типов тотальных жирных кислот в листьях исследуемых генотипов в условиях холодового стресса и на этапе восстановления с помощью метода газо-жидкостной хроматографии с последующей масс-спектрометрией.

2. По результатам 1.1-1.3 отобрать два наиболее контрастных по уровню холодоустойчивости генотипа.
3. Сравнить два отобранных генотипа по составу жирных кислот плазматической мембраны с использованием метода газо-жидкостной хроматографии с последующей масс-спектрометрией.
4. Сравнить два наиболее контрастных генотипа по показателям текучести их плазматических мембран во время воздействия холодового стресса с помощью электронного парамагнитного резонанса.
5. Оценить способность плазматической мембраны холодоустойчивого и холодовосприимчивого генотипов сохранять текучесть при снижении температуры, и выявить отличия в этих характеристиках между генотипами.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное исследование устойчивости к низким температурам трёх генотипов томата — *S. lycopersicum* MoneyMaker, Micro-Tom и *S. lycopersicoides*. С использованием интегрированного подхода, включающего физиологические (утечка электролитов, стабильность фотосистемы II (ФСII)), молекулярно-генетические (динамика изменения уровня транскриптов генов *CBF1–3 (C-box biding factors 1-3)*) и липидомные (анализ жирнокислотного (ЖК) состава липидов) методы, выявлены характерные особенности устойчивого вида *S. lycopersicoides*, отличающие его от *S. lycopersicum*. Впервые установлено, что в ответ на холодовое воздействие у *S. lycopersicoides* наблюдается увеличение уровня транскриптов гена *CBF3* и сниженный уровень транскриптов *CBF1* по сравнению с *S. lycopersicum*. Кроме того, впервые показано сохранение повышенного уровня транскриптов генов семейства *CBF* в период восстановления после холодового стресса у холодоустойчивого генотипа томата. Впервые проведён сравнительный анализ показателей текучести плазматических мембран (ПМ) во время холодового воздействия у двух контрастных по устойчивости видов томата. Установлено, что при понижении температуры холодоустойчивый вид способен сохранять структурно-функциональную стабильность плазматических мембран в более широком диапазоне температур по сравнению с чувствительным видом. Это свидетельствует о существенной роли физических свойств мембран в механизмах восприятия низких положительных температур.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая и практическая значимость работы заключается в расширении фундаментальных знаний о механизмах рецепции холодового воздействия растениями и способах борьбы с данным абиотическим стрессом. Результаты являются важным этапом совершенствования стратегий, применяемых для повышения устойчивости теплолюбивых растений к низким температурам.

Методология диссертационного исследования. Диссертационная работа выполнена с использованием физиологических, биохимических и молекулярных методов, анализа литературных данных. Первичные фотосинтетические процессы оценивали методом пульс-амплитудной модуляции флуоресценции хлорофилла; целостность клеточных мембран оценивали по степени утечки электролитов из клеток листовой ткани; выделение цитоплазматических мембран проводили с помощью дифференциального ультрацентрифугирования с последующим разделением в системе ПЭГ-декстран; анализ жирнокислотного состава проводили методом газожидкостной хроматографии–масс-спектрометрии; для анализа уровня транскриптов целевых генов использовали метод количественной ПЦР в реальном времени; текучесть плазматической мембраны оценивали методом электронного парамагнитного резонанса с использованием липофильного спинового зонда. Обработка экспериментальных данных проводилась с использованием программ RStudio, Microsoft Excel, QuantStudio Design and Analysis Software v2.5.

Положения, выносимые на защиту.

1. **Текучесть плазматической мембраны может рассматриваться как один из факторов первичного восприятия низких температур у растений томата.** Изменения физического состояния плазматической мембраны, вероятно, являются ранним звеном механизма рецепции холодового сигнала. Подобная роль изменений текучести мембран ранее показана у цианобактерий, что позволяет предполагать наличие сходных принципов температурной рецепции.
2. **Сохранение текучести плазматической мембраны может являться одним из факторов холодоустойчивости растений.** При понижении температуры ниже физиологического оптимума холодоустойчивый вид томата дольше сохраняет текучесть плазматической мембраны по сравнению с теплолюбивым, что обеспечивает устойчивость структурных и функциональных свойств клеток в условиях холодового стресса.
3. ***S. lycopersicoides*** **характеризуется повышенной устойчивостью к низким положительным температурам.** Его физиологические и молекулярные особенности указывают на возможность использования данного вида в качестве генетического ресурса при селекции культурных сортов томата на холодоустойчивость.

Степень достоверности. Все исследования сопровождались необходимым количеством биологических и аналитических повторов, что гарантирует достоверность и воспроизводимость полученных результатов. Основные выводы подкреплены экспериментальными данными и сопоставимы с результатами, ранее опубликованными в рецензируемых научных изданиях. Более 80% изложенной информации было отражено в авторских публикациях.

Степень разработанности темы. Ключевую роль в формировании устойчивости к низким температурам у высших растений играют гены *COR* (*cold-responsive*). Их экспрессия индуцируется транскрипционными факторами семейства *CBF* (Liu, et al., 2017, Shi et al., 2018). Активация *CBF*, в свою очередь, требует повышения концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле (Knight et al., 1991, Plieth et al., 1999, Knight et al., 2002, Mori et al., 2018, Wang et al., 2019). Увеличение цитозольного Ca^{2+} связано с активацией кальциевых каналов ПМ. Однако механизмы, приводящие к открытию этих каналов при воздействии низких температур, до настоящего времени остаются неясными. Таким образом, если завершающие этапы сигнального каскада в ответ на холодовое воздействие у высших растений охарактеризованы достаточно подробно, то его начальные стадии до сих пор недостаточно изучены. Существует гипотеза, согласно которой пусковым фактором активации Ca^{2+}-каналов может служить физическое уплотнение мембраны, обусловленное воздействием низких положительных температур (при понижении температуры тепловое движение молекул замедляется, ацильные остатки липидов начинают располагаться

ближе друг к другу, мембрана «уплотняется», становится более вязкой), однако прямых экспериментальных подтверждений этой модели пока не получено. Ранее о роли плазматической мембраны в рецепции холодового воздействия было сообщено в исследованиях, проведенных на синезеленых водорослях. Было продемонстрировано, что текучесть мембран играет важную роль в восприятии холода. Низкая температура приводит у данных организмов к более плотной упаковке мембранных липидов и снижению текучести мембраны (Los et al., 2013). Данное повышение вязкости оказывает влияние на конформацию белка гистидинкиназы Hik33, что приводит к активации каскада фосфорилирования и индукции генов холодоустойчивости. Эти данные позволяют предположить, что изменение текучести мембран может выполнять аналогичную сигнальную функцию и у высших растений. Следует подчеркнуть, что наличие связи между текучестью мембраны и восприимчивостью к холоду доказано неоднократно, но не показано, что именно изменение состояния мембраны является первичным рецептором холода. В связи с этим целью исследования является проверка гипотезы о возможной роли текучести мембраны как первичного рецептора холода. Для этого поставлена задача получить ответ на вопрос: будет ли мембрана устойчивого к низким положительным температурам вида дольше сохранять текучесть при понижении температуры по сравнению с мембраной чувствительного вида?

Публикации и апробация работы. По теме диссертации опубликовано 3 статьи, из которых 3 – в международных рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК РФ и включенных в Web of Science. Результаты работы были представлены в виде устных докладов на научных конференциях: 28-я Пущинская школа-конференция молодых ученых с международным участием «Биология - наука XXI века» (Пущино, 21–24 апреля 2025 года); Всероссийская научная конференция с международным участием и школа для молодых ученых «Липиды-2025» (Петрозаводск, 8–12 сентября 2025 года). Результаты и выводы работы докладывались и обсуждались на научных семинарах Института физиологии растений имени К. А. Тимирязева РАН и на научных семинарах кафедры физиологии растений биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова.

Личный вклад автора в исследование. Автор принимал участие во всех этапах работы, осуществлял самостоятельное планирование и проведение экспериментов, анализ полученных данных и подготовку научных рукописей. Большая часть экспериментального материала была получена самим автором или с его непосредственным участием.

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация имеет стандартную структуру и состоит из титульного листа, оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка использованной литературы. Материалы диссертации изложены на 111 страницах и содержат 4 таблицы и 11 рисунков. Список использованной литературы состоит из 189 источников.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящее исследование состояло из двух этапов. На первом этапе проводилось сравнительное изучение холодоустойчивости трёх генотипов томата: двух сортов тепличного вида *Solanum lycopersicum* — MoneyMaker и Micro-Tom (оптимальный температурный диапазон роста +18 °C - +25 °C), а также дикого перуанского вида *Solanum lycopersicoides*, характеризующегося широким диапазоном температурного оптимума (+10 °C - +25 °C). Целью первого этапа было выявление двух генотипов, наиболее контрастных по уровню устойчивости к холодовому стрессу. Для этого растения подвергались воздействию пониженной температуры (+6 °C), после чего степень выраженности их реакции на стрессовый фактор оценивалась по ряду физиолого-молекулярных показателей (уровень транскриптов маркерных генов холодового ответа, снижение флуоресценции хлорофилла, степень утечки электролитов). Дополнительно проводился анализ динамики изменений суммарного содержания жирных кислот (ЖК) в условиях холодового воздействия. По совокупности полученных данных были отобраны два генотипа, наиболее контрастные по чувствительности к стрессу от низких положительных температур.

Вторая часть работы выполнялась на двух отобранных генотипах и была направлена на сравнительное исследование свойств их цитоплазматических мембран — анализировалась температурная зависимость текучести мембран, то есть то, с какой скоростью происходит изменение текучести при понижении температуры. Параллельно проводился анализ ЖК-состава плазматических мембран и мембран внутриклеточных органелл в контрольных условиях.

Объекты исследования и условия выращивания растений. Объектами исследования служили три генотипа томата, различающиеся по уровню холодоустойчивости: два культивируемых сорта *Solanum lycopersicum* — MoneyMaker (LA2706) и Micro-Tom (LA2706), а также дикий вид *Solanum lycopersicoides* (LA2781), произрастающий в высокогорных районах Южной Америки и характеризующийся повышенной устойчивостью к пониженным температурам. Семена всех генотипов были получены из Tomato Genetics Resource Center (Университет Калифорнии, Дэвис, США).

Растения выращивали в условиях контролируемой климатической камеры при температуре 25 ± 1 °C, фотопериоде 16 ч света и 8 ч темноты и плотности потока фотонов около 400 μмоль·м$^{-2}$·с$^{-1}$ на уровне листьев. В качестве источников света использовали белые светодиоды (Epistar, Тайвань) с нейтральной цветовой температурой 4000-4500 К. Указанные условия обеспечивали нормальный рост и развитие растений без индукции дополнительного стрессового воздействия.

Воздействие низких температур и схема отбора образцов. Для моделирования холодового стресса шестинедельные растения переносили в климатическую камеру с температурой +6 °C. Длительность холодового воздействия составляла 48 ч, при этом освещённость и фотопериод сохраняли идентичными контрольным условиям. Отбор листового материала проводили поэтапно во временной динамике холодового воздействия: до начала воздействия (0 ч), через 0,3 ч (20 мин), 1 ч и 2 ч после начала стресса, а также после 48 ч непрерывного пребывания при низкой температуре. Для анализа восстановительных процессов растения возвращали в оптимальные условия выращивания, и через 48 ч восстановления (96 ч от начала эксперимента) проводили дополнительный отбор проб. Листовой материал немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при −80 °C до проведения биохимических и молекулярно-биологических

анализов. Такой экспериментальный дизайн позволял оценить как ранние, так и долговременные реакции растений на холодовой стресс, а также особенности фазы восстановления.

Оценка фотохимической активности фотосистемы II. Функциональное состояние фотосинтетического аппарата оценивали по эффективному квантовому выходу фотосистемы II Y(II), который является интегральным показателем способности растений использовать поглощённую световую энергию для фотохимических процессов. Измерения проводили методом импульсно-модулированной флуориметрии с использованием флуориметра MINI-PAM-II (Heinz Walz GmbH, Германия). Измерения были проведены на неповрежденных листьях растений, подвергнутых воздействию постоянного света, составляющего около 400 μмоль·м$^{-2}$·с$^{-1}$. Интенсивность импульса насыщающего света составляла 10 000 μмоль·м$^{-2}$·с$^{-1}$.

Определение степени утечки электролитов. Целостность клеточных мембран оценивали по степени утечки электролитов из клеток листовой ткани. Для этого использовали стандартный метод, основанный на измерении электропроводности инкубационного раствора до и после полного разрушения клеток. Степень утечки электролитов рассчитывали как отношение начальной электропроводности к максимальной, выраженное в процентах, что позволяло количественно оценить уровень повреждения мембран при холодовом воздействии.

Выделение мембранных фракций. Фракции тилакоидных мембран, плазматической мембраны и мембран внутриклеточных органелл выделяли из листьев томата. Все этапы проводили при +4 °C. Разделение осуществляли методом дифференциального центрифугирования с последующим двухфазным разделением в системе ПЭГ–декстран. Полученные мембранные фракции использовали для последующего анализа липидного состава и физического состояния мембран. Оценку качества разделения мембран проводили на основании анализа ферментативной активности H^+-АТФаз P- и V-типов в разных фракциях.

Экстракция и анализ жирнокислотного состава. Экстракцию суммарных липидов из листьев и выделенных мембранных фракций проводили с использованием органических растворителей. ЖК переводили в метиловые эфиры, которые анализировали методом газожидкостной хроматографии–масс-спектрометрии на приборе Agilent 7890F GC/MS. Идентификацию и количественное определение индивидуальных ЖК осуществляли с использованием библиотеки спектров NIST и внутреннего стандарта.

Выделение РНК и анализ уровня транскриптов генов холодового ответа. Тотальную РНК выделяли из листьев томата, измельчённых в жидком азоте, с использованием коммерческого набора. Обратную транскрипцию проводили с применением MMLV-ревертазы. Относительный уровень транскриптов генов холодового ответа *CBF1, CBF2, CBF3* и определяли методом ПЦР в реальном времени с использованием SYBR Green. Расчёт проводили по методу ΔΔCt с нормализацией на уровень транскриптов референсных генов *RPL2 (*Ribosomal Protein L2*)* и *PP2Ac (*Protein Phosphatase 2A*)*. Амплификацию выполняли на приборе QuantStudio 1 (Applied Biosystems, США).

Оценка текучести плазматической мембраны. Физическое состояние плазматической мембраны оценивали методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) с использованием липофильного спинового зонда 5-доксилстеарата с помощью

спектрометра модели E-4 (Varian Inc., USA). Параметры ЭПР-спектров использовали в качестве показателя текучести липидного бислоя мембраны.

Статистическая обработка данных. Все эксперименты проводили как минимум в трёх биологических повторностях. Результаты представлены в виде средних значений ± стандартное отклонение. Для оценки статистической значимости различий использовали дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим тестом Тьюки. Различия считались значимыми при $p < 0,05$. В случае если выборка была не из нормального распределения, применяли критерий Краскела-Уоллиса с последующим тестом Данна.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования с использованием трёх независимых подходов — анализа степени утечки электролитов, оценки эффективного квантового выхода фотосистемы II (ФС II), а также анализа уровня транскриптов генов холодового ответа — была экспериментально подтверждена высокая устойчивость перуанского вида *S. lycopersicoides* к воздействию низких температур. В противоположность этому оба тепличных сорта вида *S. lycopersicum* проявляли выраженную чувствительность к холодовому стрессу, при этом сорт Micro-Tom характеризовался несколько большей устойчивостью по сравнению с MoneyMaker. В совокупности полученные данные позволяют заключить, что генотипы MoneyMaker и *S. lycopersicoides* являются наиболее контрастными по уровню холодоустойчивости. На втором этапе работы сравнение текучести ПМ двух видов методом ЭПР показало, что для изменения текучести мембраны перуанского вида *S.lycopersicoides* требуется бóльшая разность температур, чем для аналогичного изменения у тепличного вида. Иными словами, перуанский вид способен поддерживать оптимальную текучесть в большем диапазоне температур по сравнению с тепличным.

Физиологические проявления холодового стресса. Визуальная оценка состояния растений показала, что воздействие низкой температуры вызывало развитие ответа на стресс у сортов *S. lycopersicum*, тогда как у *S. lycopersicoides* внешние признаки повреждения отсутствовали. У MoneyMaker уже в первые сутки воздействия наблюдались потеря тургора, хлороз и локальные некротические участки листовой пластинки. У Micro-Tom данные проявления были менее выраженными и возникали на более поздних этапах эксперимента, что указывает на промежуточный уровень устойчивости данного сорта. В отличие от этого, растения *S. lycopersicoides* сохраняли исходный тургор и окраску листьев даже при длительном воздействии холода.

Оценка целостности мембран по степени утечки электролитов подтвердила данные визуального анализа (рис. 1А). У MoneyMaker резкое увеличение утечки электролитов регистрировалось уже на ранних стадиях холодового воздействия, что свидетельствует о быстром нарушении проницаемости мембран. У Micro-Tom повышение данного показателя происходило значительно медленнее и достигало меньших значений. У *S. lycopersicoides* степень утечки электролитов на протяжении всего эксперимента не отличалась от контрольных значений, что указывает на высокую устойчивость мембран к воздействию низких положительных температур.

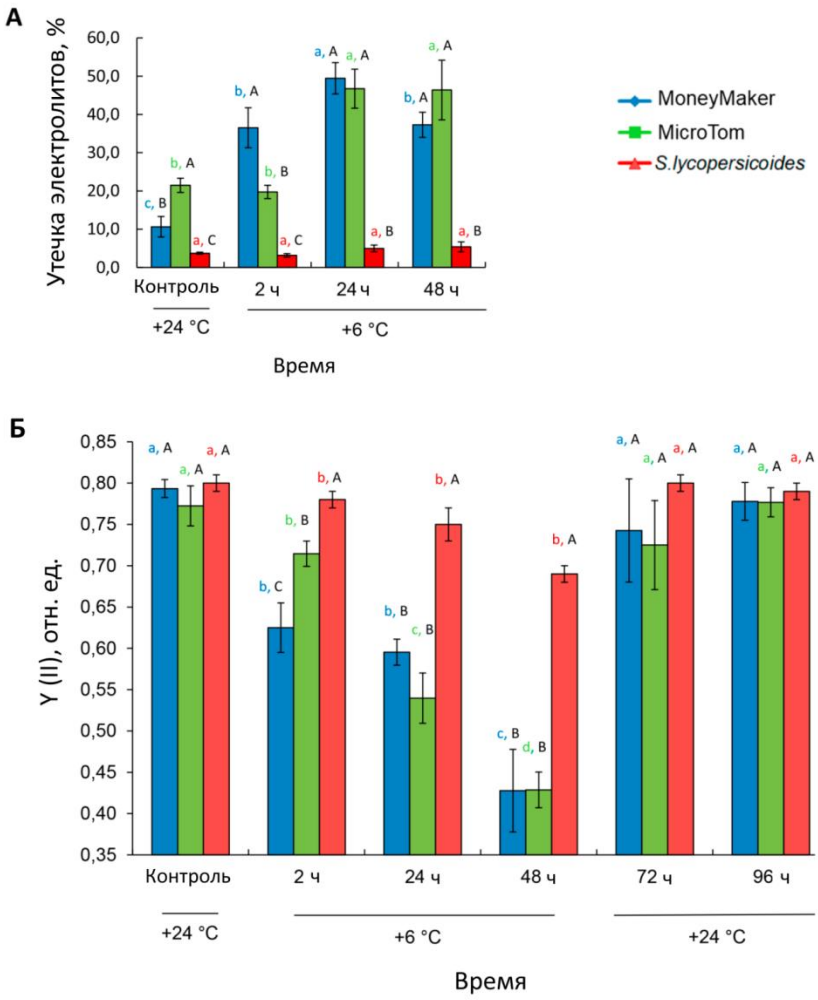

Рис. 1 — (А) Анализ степени утечки электролитов (%) из листьев *S. lycopersicum* и *S. lycopersicoides* в течение 48 часов воздействия холода. (Б) Эффективный квантовый выход ФС II (Y(II)) у исследуемых томатов *S. lycopersicum* (сорта MoneyMaker и Micro-Tom) и *S. lycopersicoides* при обработке холодом и при последующем восстановлении. Значения представляют собой средние значения ± стандартные отклонения по крайней мере для трех биологических повторностей. Разные строчные буквы указывают на статистически значимые различия между временными точками внутри одного вида; заглавные буквы обозначают значимые различия между видами в один и тот же момент времени ($p < 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом Тьюки).

Измерение эффективного квантового выхода ФС II (Y(II)) показало, что воздействие низких положительных температур приводило к снижению фотохимической активности у всех исследованных генотипов, однако степень и динамика этих изменений существенно различались (рис. 1Б). У MoneyMaker уже в первые часы воздействия холодового стресса наблюдалось снижение параметра Y(II), что указывает на ингибирование фотохимических реакций. У Micro-Tom снижение параметра Y(II) было менее выраженным и развивалось постепенно, тогда как у *S. lycopersicoides* изменения данного показателя носили минимальный характер и не выходили за пределы контрольных значений. Эти данные

указывают на более эффективные механизмы защиты фотосинтетического аппарата у *S. lycopersicoides*.

Определение уровня транскриптов генов холодового ответа. Анализ уровня транскриптов генов *CBF1, CBF2, CBF3* показал, что холодовой стресс индуцирует активацию *CBF*-зависимого сигнального пути у всех исследованных генотипов, однако характер изменения уровня транскриптов существенно различается (рис. 2 и 3).

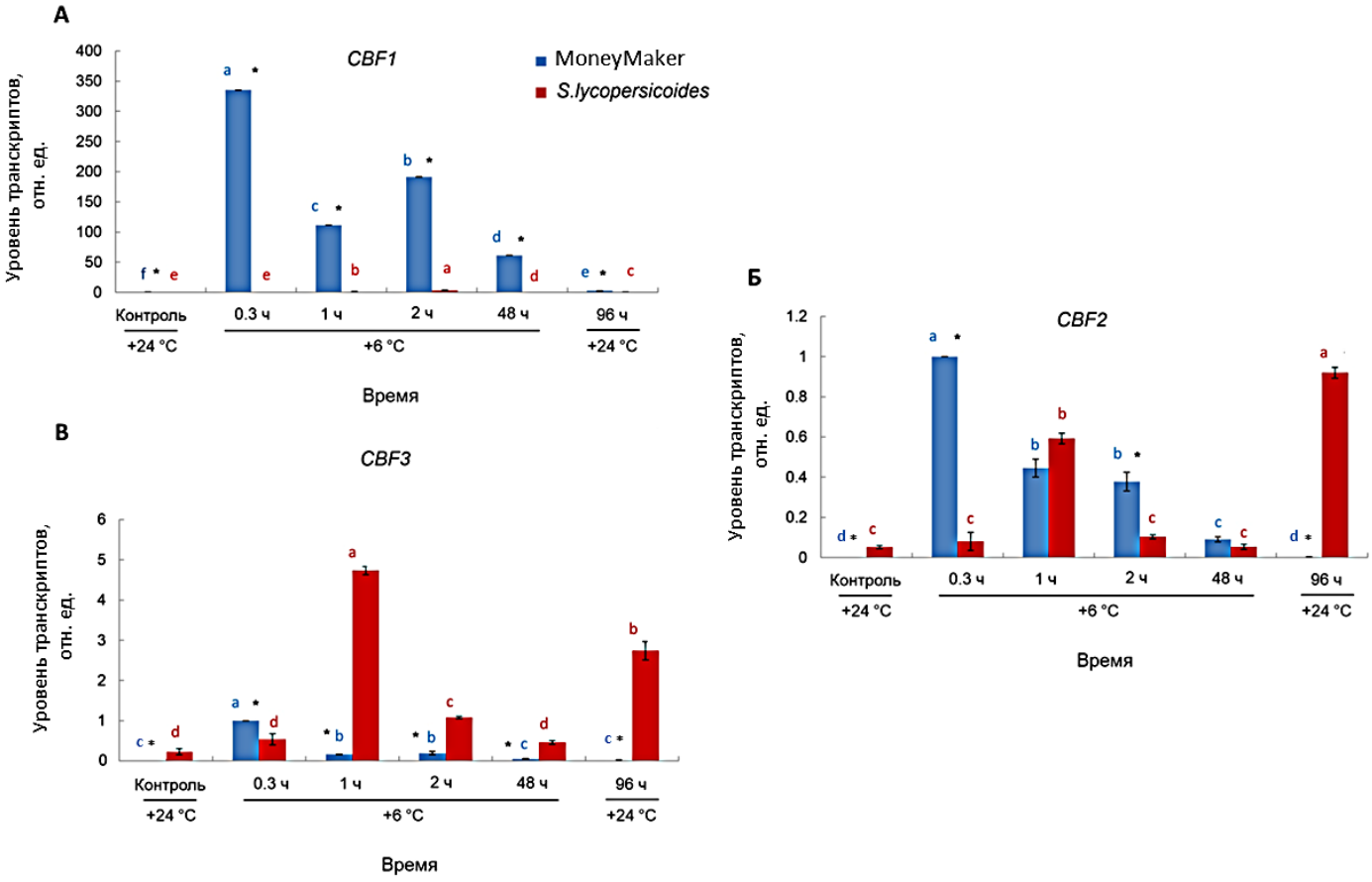

Рис. 2 — Уровень транскриптов генов *CBF1* (А), *CBF2* (Б), *CBF3* (В) в образцах листьев томата *S. lycopersicum* (сорт MoneyMaker) и *S. lycopersicoides* в течение эксперимента. За единицу везде, кроме как для *CBF1*, принят уровень транскриптов исследуемого гена у *S. lycopersicum* сорт MoneyMaker в точке «0,3 ч». При анализе уровня транскриптов *CBF1* за единицу принимали уровень транскриптов данного гена у *S. lycopersicoides* в точке «1 ч». Строчные буквы указывают на значимые различия в разные временные точки внутри одного вида; звездочки (*) указывают на существенные межвидовые различия в один и тот же момент времени ($p < 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом Тьюки)

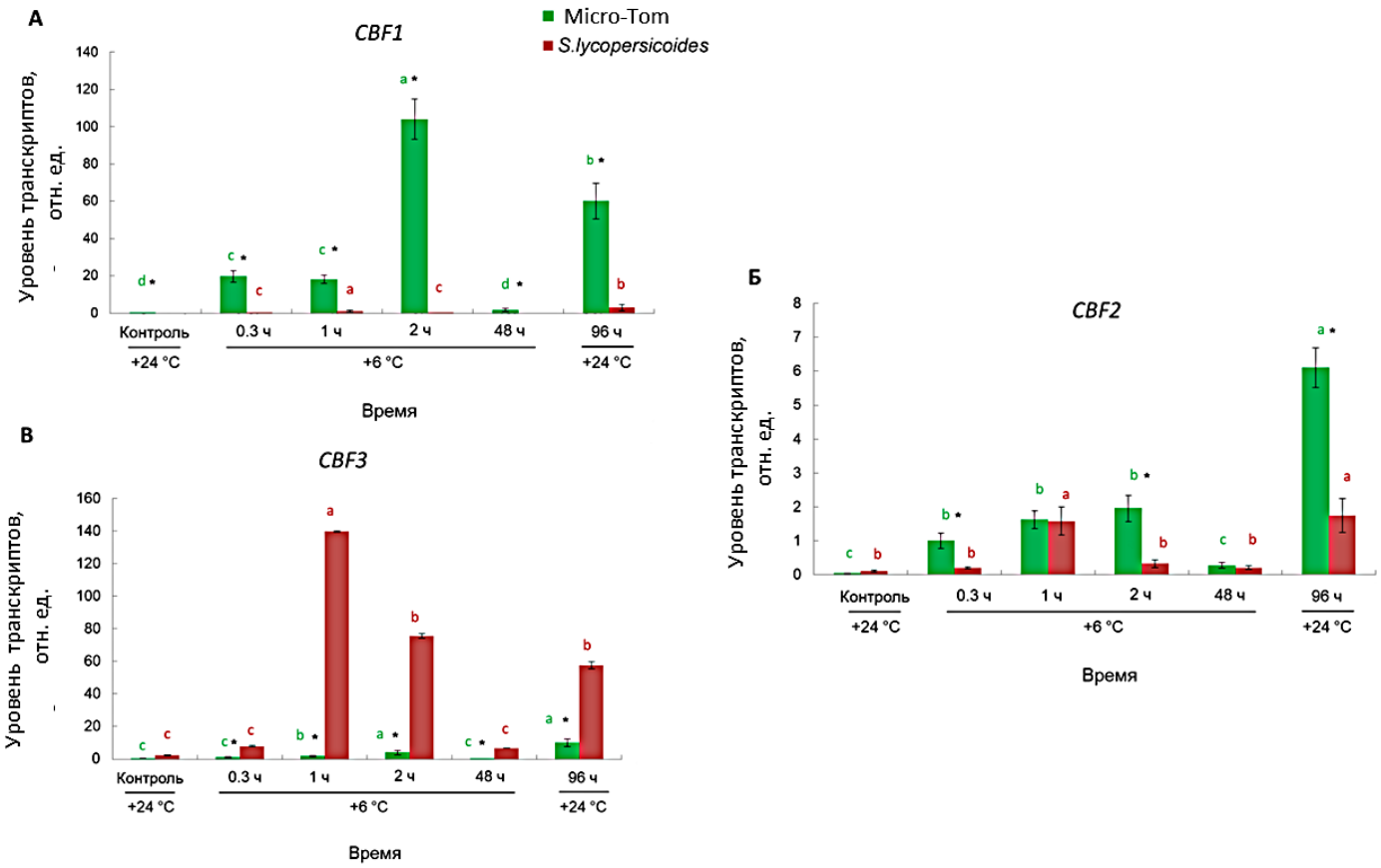

Рис. 3 — Уровень транскриптов генов *CBF1* (А), *CBF2* (Б), *CBF3* (В) в образцах листьев томата *S. lycopersicum* (сорт Micro-Tom) и *S. lycopersicoides* в течение эксперимента. За единицу везде, кроме как для *CBF1*, принимали уровень транскриптов исследуемого гена у *S. lycopersicum* сорт Micro-Tom в точке «0.3 ч». При анализе уровня транскриптов *CBF1* за единицу принимали уровень транскриптов данного гена у *S. lycopersicoides* в точке «1 ч». Строчные буквы указывают на значимые различия в разные временные точки внутри одного вида; звездочки (*) указывают на существенные межвидовые различия в один и тот же момент времени ($p < 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом Тьюки)

У сортов *S. lycopersicum* наиболее выраженным было увеличение уровня транскриптов гена *CBF1*, который, согласно данным литературы, ассоциирован с чувствительностью растений к холодовому стрессу. Особенно высокий уровень транскриптов *CBF1* наблюдался у MoneyMaker, что дополнительно подтверждалось физиологическими показателями.

У *S. lycopersicoides*, напротив, уровень транскриптов *CBF1* оставался относительно низким, тогда как уровень транскриптов *CBF3* — гена, ассоциированного с формированием холодоустойчивости, — был значительно выше по сравнению с сортами *S. lycopersicum*.

Уровень транскриптов *CBF2* был сопоставим у всех генотипов и, вероятно, данный ген выполняет универсальную регуляторную функцию.

Анализ временной динамики показал, что у MoneyMaker максимальное содержание транскриптов *CBF*-генов наблюдалось уже через 20 мин после начала воздействия пониженной температуры, что указывает на резкую стрессовую реакцию. У Micro-Tom и *S. lycopersicoides* максимальное содержание транскриптов регистрировалось через 1–2 ч. В фазе восстановления повышенный уровень транскриптов *CBF* сохранялся у Micro-Tom и *S. lycopersicoides*, но практически отсутствовал у MoneyMaker.

Анализ тотального ЖК-состава листьев трех генотипов во временной динамике холодового воздействия. В работе мы проводилось два типа исследования ЖК-состава растений. В первом случае сравнивали тотальный состав ЖК листьев трех исследуемых генотипов во временной динамике ответа на холодовой стресс. Данное исследование не позволяет проанализировать особенности состава именно ПМ клеток, но даёт возможность оценить комплексный биохимический ответ на стресс.

Данный ЖК-анализ показал, что в контрольных условиях у всех исследованных образцов наибольшее содержание в листьях имеет 9,12,15-18:3 ЖК, содержание которой у *S. lycopersicoides* (51,3%) наибольшее при сравнении с сортами *S. lycopersicum* (44% и 45%). Содержание остальных мажорных ЖК у всех томатов сопоставимо. 9,12,15-18:3 имеет наибольшее содержание в клетках растений и основное ее место локализации – это тилакоидные мембраны, где она, входя в состав моногалактозилдиацилглицеридов и дигалактозилдиацилглицеридов, обеспечивает поддержание необходимой текучести и участвует в формировании кривизны мембраны (Hölzl et al., 2019; Fujii et al., 2019). По этой причине данная ЖК необходима для оптимальной работы фотосинтетических комплексов (ФС I, ФС II, цитохром *b6f*-комплекс, АТФ-синтаза), требующих подвижной липидной среды. Также данная ЖК участвует в защите от фотоокислительного стресса (Jimbo et al.,2023). В целом ЖК-профили у трех генотипов сходны, однако в условиях холодового стресса выявлены различия в характере изменения нескольких ЖК. Наиболее выраженные изменения характерны для сорта Micro-Tom: отмечается увеличение содержания насыщенных ЖК (16:0 и 18:0) и снижение триеновых форм (7,10,13-16:3 и 9,12,15-18:3). Показатели содержания ряда ЖК (7,10,13-16:3, 18:0 и 9-18:1) у Micro-Tom в условиях холодового стресса изменяется в сторону, сближающую их с таковыми показателями для *S. lycopersicoides*. У MoneyMaker и *S. lycopersicoides* существенных изменений не наблюдалось.

В первой части работы мы сравнивали три типа томатов: два сорта вида *S. lycopersicum* (сорт MoneyMaker, сорт Micro-Tom) и вид *S. lycopersicoides* в отношении их устойчивости к низким положительным температурам. Известно, что *S. lycopersicoides,* произрастающий в высокогорьях Перу отличается от тепличного томата способностью переносить холод, и таким образом, мы имели целью сравнить контрастные по устойчивости к холоду виды. Тремя независимыми методами (анализ степени утечки электролитов, анализ максимального эффективного квантового выхода ФС II, анализ уровня транскриптов *CBF*) мы экспериментально подтвердили устойчивость перуанского *S. lycopersicoides* к холодовому стрессу. Напротив, оба сорта вида *S. lycopersicum* демонстрировали чувствительность к холоду, однако отличались друг от друга по степени восприимчивости к стрессу. Физиологические характеристики сорта Micro-Tom показывали большую стабильность при воздействии низкотемпературного стресса по сравнению с таковыми для сорта MoneyMaker. При анализе уровня транскриптов наблюдалось некоторое сходство молекулярных ответов между сортом Micro-Tom и

видом *S. lycopersicoides:* максимальный уровень транскриптов *CBF* достигался в течение 1–2 часов после начала воздействия, наличие повышенного уровня транскриптов *CBF* в период восстановления. Анализ ЖК-состава клеток листьев показал, что в условиях холодового стресса формируется сходство между сортом Micro-Tom и видом *S. lycopersicoides*, а также выявил высокое содержание 9,12,15-18:3 у *S. lycopersicoides*, что может являться одной из причин его повышенной устойчивости. Обобщение физиологических, молекулярных и биохимических характеристик трех исследованных томатов в условиях холодового стресса представлено в табл. 1.

Таблица 1 — Сравнение *S. lycopersicum* сорт MoneyMaker, *S. lycopersicum* сорт Micro-Tom, *S. lycopersicoides* по физиологическим, молекулярным и биохимическим характеристикам при ответе на холодовой стресс

	Тип томата		
Тип эксперимента	MoneyMaker	Micro-Tom	*S. lycopersicoides*
Утечка электролитов	Детектируется через 4 часа от начала эксперимента	Детектируется через 1 сутки от начала эксперимента	Нет в течение эксперимента
Снижение Y(II)	Сильно выраженно	Средне выраженно на начальных этапах	Слабо выраженно
Уровень транскриптов гена-маркера восприимчивости холодового воздействия *CBF1*	Высокий	Высокий	Низкий
Уровень транскриптов *CBF2*	Одинаков у трех типов		
Уровень транскриптов гена-маркера устойчивости к холоду *CBF3*	Низкий	Низкий	Высокий
Наличие транскриптов *CBF* в период восстановления	Нет	Есть	Есть
Время от начала холодового воздействия, соответствующее максимальному уровню транскриптов *CBFs*	20 мин	2 часа	1 час
Особенности изменений ЖК состава во временной динамике эксперимента	ИН не меняется	ИН падает: снижается содержание 16:3, 18:3, повышается 16:0, 18:0. Содержание 10,13-16:3, 18:0, 9-18:1 стремится к таковому для S. lycopersicoides	ИН не меняется
Контрольное общее содержание 9,12,15-18:3	44%	45%	51,3%

По результатам первой части работы мы определили два наиболее контрастных генотипа – *S. lycopersicoides* и MoneyMaker. Далее работа была сфокусирована на сравнении свойств их ПМ – изучалось то, как быстро изменяется текучесть при изменении температуры. Параллельно с этим проводился анализ ЖК-состава ПМ и других мембранных органелл этих видов в контрольных условиях.

Анализ ЖК-состава фракционированных органелл листьев у контрастных к холоду MoneyMaker и *S. lycopersicoides*. Анализ ЖК-состава фракционированных органелл листьев у контрастных к воздействию холодового стресса MoneyMaker и *S. lycopersicoides* имел целью выявить базовые различия ЖК-профилей разных органелл в контрольных условиях. Для определения процентного содержания ЖК в различных органеллах, также как и для определения тотального содержания ЖК, использовали метод ГЖХ-МС. Предварительно ткани листьев подвергали дифференциальному ультрацентрифугированию для разделения мембранных фракций на цитоплазматическую, тилакоидную и фракцию мембран внутриклеточных органелл (сюда относились мембраны эндоплазматического ретикулума, тонопласта, аппарата Гольджи). Мембранные фракции исследовали на АТФазную активность с целью дополнительного подтверждения их принадлежности соответствующим органеллам. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 — ЖК-состав (% от общего содержания ЖК) трех разных мембранных фракций (плазматическая мембрана, тилакоиды и внутриклеточные мембраны) листьев MoneyMaker и *S. lycopersicoides* в контрольных условиях. Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение (не менее, чем три биологические повторности). Значимые различия в содержании каждой жирной кислоты между типами мембран в пределах одного вида обозначены разными строчными буквами. Звездочки (*) обозначают значимые различия в содержании жирных кислот в одной и той же фракции между разными видами ($p < 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим тестом Тьюки). Для каждого вида жирные кислоты, уровень которых достоверно различался во всех трех типах мембран, выделены жирным шрифтом

	MoneyMaker				***S. lycopersicoides***			
	Жирная кислота	Плазмалемма	Тилакоидная мембрана	Внутриклеточные мембраны (ЭР, АГ, тонопласт)	**Жирная кислота**	Плазмалемма	Тилакоидная мембрана	Внутриклеточные мембраны (ЭР, АГ, тонопласт)
Насыщенные	*Лауриновая* 12:0		н.о.	н.о.	*Лауриновая* 12:0	0.1 ± 0.01 ^{b}	0.2 ± 0.1 ^{a}	н.о.
	Миристиновая 14:0	0.3 ± 0.1 ^{a}	0.4 ± 0.1 ^{a}	0.3 ± 0.04 ^{a}	*Миристиновая* 14:0	0.4 ± 0.1 ^{b}	0.8 ± 0.1 ^{a*}	0.4 ± 0.1 ^{b}
	Пентадекановая 15:0	0.3 ± 0.02 ^{a}	следы	0.4 ± 0.03 ^{a}	*Пентадекановая* 15:0	0.3 ± 0.1 ^{b*}	0.8 ± 0.1 ^{a*}	0.3 ± 0.1 ^{b}
	***Пальмитиновая* 16:0**	37.0 ±0.6 ^{a}	16.9 ± 1.1 ^{c}	35.9 ± 0.8 ^{b}	***Пальмитиновая* 16:0**	24.7 ± 0.3 ^{a*}	15.1 ± 0.7 ^{c}	19.1 ± 0.4 ^{b*}
	***Стеариновая* 18:0**	5.6 ± 0.7 ^{a}	1.3 ± 0.1 ^{c}	3.9 ± 0.1 ^{b}	*Стеариновая* 18:0	4.6 ± 0.3 ^{a}	3.6 ± 0.5 ^{a*}	3.1 ± 0.1 ^{a*}
	***Нонадекановая* 19:0**	0.1 ± 0.01 ^{a}	н.о.	0.1 ± 0.01 ^{b}	*Нонадекановая* 19:0	н.о.	н.о.	0.2 ± 0.02
	***Арахиновая* 20:0**	1.8 ± 0.1 ^{a}	0.4 ± 0.1 ^{c}	0.9 ± 0.04 ^{b}	*Арахиновая* 20:0	1.2 ± 0.04 ^{a*}	0.8 ± 0.1 ^{b*}	0.7 ± 0.02 ^{b}
	Гени-козановая 21:0	н.о.	н.о.	н.о.	*Гени-козановая* 21:0	0.4 ± 0.1 ^{a}	н.о.	0.3 ± 0.02 ^{a}
	***Бегеновая* 22:0**	1.3 ± 0.1 ^{a}	0.2 ± 0.02 ^{c}	0.5 ± 0.1 ^{b}	*Бегеновая* 22:0	0.8 ± 0.1 ^{a*}	0.4 ± 0.04 ^{b*}	0.5 ± 0.1 ^{b}

Окончание таблицы 2

	MoneyMaker				***S. lycopersicoides***			
	Жирная кислота	Плазмалемма	Тилакоидная мембрана	Внутриклеточные мембраны (ЭР, АГ, тонопласт)	**Жирная кислота**	Плазмалемма	Тилакоидная мембрана	Внутриклеточные мембраны (ЭР, АГ, тонопласт)
Насыщенные	***Трикозановая* 23:0**	0.7 ± 0.1 [a]	н.о.	0.3 ± 0.1 [b]	***Трикозановая* 23:0**	0.6 ± 0.03 [a*]	н.о.	0.3 ± 0.1 [b]
	***Лигноцериновая* 24:0**	1.2 ± 0.1 [a]	н.о.	0.4 ± 0.1 [b]	***Лигноцериновая* 24:0**	1.3 ±0.4 [a]	н.о.	0.4 ± 0.1 [b]
	Пентакозановая 25:0	0.2 ± 0.01	н.о.	н.о.	*Пентакозановая* 25:0	0.1 ± 0.2 [*]	н.о.	н.о.
Моноеновые	*7-гексадеценовая* 7-16:1	0.5 ± 0.02 [b]	0.9 ± 0.1 [a]	0.7 ± 0.1 [a]	*7-гексадеценовая* 7-16:1	1.6 ± 0.1 [a*]	1.8 ± 0.2 [a*]	2.0 ± 0.1 [a*]
	Пальмитолеиновая 9-16:1	0.5 ± 0.02 [b]	0.4 ± 0.1 [b]	0.6 ± 0.01 [a]	*Пальмитолеиновая* 9-16:1	н.о.	н.о.	н.о.
	***14-гексадеценовая* 14-16:1**	0.6 ± 0.02 [a]	0.2 ± 0.1 [c]	0.4 ± 0.04 [b]	*14-гексадеценовая* 14-16:1	0.5 ± 0.1 [a]	0.4 ± 0.01 [a*]	0.3 ± 0.02 [a]
	Олеиновая 9-18:1	4.2 ± 0.3 [a]	2.3 ± 0.1 [b]	2.5 ± 0.1 [b]	*Олеиновая* 9-18:1	7.2 ±0.3 [a*]	7.9 ± 0.4 [a*]	6.1 ± 0.2 [b*]
	Вакценовая 11-18:1	н.о.	0.8 ± 0.1 [a]	0.8 ± 0.02 [a]	*Вакценовая* 11-18:1	0.1 ± 0.04 [a]	0.2 ± 0.03 [a*]	0.2 ± 0.02 [a*]
Диеновые	7,10-гексадекадиеновая 7,10-16:2	следы	0.3 ± 0.01 [a]	следы	7,10-гексадекадиеновая 7,10-16:2	0.2 ± 0.1 [a*]	0.3 ± 0.02 [a]	0.3 ± 0.1 [a*]
	Линолевая 9,12-18:2	26.8 ± 0.2 [a]	17.5 ± 0.1 [a]	23.9 ± 0.4 [a]	*Линолевая* 9,12-18:2	14.3 ± 0.1 [a*]	12.5 ± 0.3 [a*]	13.0 ± 0.2 [a*]
Триеновые	***7,10,13-гексадекатриеновая* 7,10,13-16:3**	1.1 ± 0.1 [c]	8.3 ± 0.3 [a]	2.7 ± 0.1 [b]	*7,10,13-гексадекатриеновая* 7,10,13-16:3	3.9 ± 0.4 [b*]	6.6 ± 0.8 [a*]	6.0 ± 0.3 [a*]
	***α-линоленовая* 9,12,15-18:3**	16.9 ± 0.3 [c]	50.1 ± 1.1 [a]	25.9 ± 0.2 [b]	*α-линоленовая* 9,12,15-18:3	37.9 ± 0.9 [b*]	48.6 ± 0.2 [a]	46.9 ± 0.7 [a*]
	ИН	1.1 ± 0.01 [c]	2.2 ± 0.0 [a]	1.4 ± 0.01 [b]	**ИН**	1.6 ± 0.03 [c*]	2.0 ± 0.02 [a*]	1.9 ± 0.01 [b*]

В первую очередь необходимо сравнить, как различаются между собой ЖК-составы разных фракций внутри одного вида. Для *S. lycopersicum* (MoneyMaker) количество типов ЖК, которые различаются во всех трех типах фракций составляет десять (выделенные жирным шрифтом в таблице 2 - 16:0,14-16:1, 7,10,13-16:3, 18:0, 9,12,15-18:3, 19:0, 20:0, 22:0, 23:0, 24:0). При этом для *S. lycopersicoides* данный показатель равен трем - 16:0, 23:0, 24:0). Далее под «типизацией мембран» будем понимать различия в липидном составе мембран разных фракций сорта MoneyMaker, обусловленные их функциональными особенностями. Таким образом, мы видим, что мембраны разных компартментов MoneyMaker более специализированы и сильнее отличаются друг от друга, тогда как у *S. lycopersicoides* разница в ЖК-составе разных мембранных фракций выражена в меньшей степени и они, можно сказать, более универсальны. Данный результат можно рассматривать в рамках правила: чем более специализирован вид, тем труднее ему выжить при смене условий. Возможно, мембрана *S. lycopersicoides*, которая более универсальна, легче адаптируется к изменениям температуры за счет отсутствия «типизации». Наоборот, MoneyMaker менее приспособлен к температурным изменениям ввиду специализации мембран. Таким образом, полученные данные указывают на *S. lycopersicoides*, как на более холодоустойчивый вид по сравнению с *S. lycopersicum* (MoneyMaker). Еще одним крайне важным наблюдением является содержание 9,12,15-18:3 и 7,10,13-16:3 ЖК. У MoneyMaker эти кислоты преобладают в мембране тилакоидов, и их значительно меньше в плазмалемме и других клеточных мембранах. Напротив, у *S. lycopersicoides* высокая доля этих жирных кислот сохраняется во всех трёх мембранных фракциях. Учитывая особую регуляторную роль, которая показана для этих кислот в составе тилакоидных мембран, а также учитывая выявленную связь их содержания в плазмалемме с устойчивостью к холоду *S. lycopersicoides*, можно говорить, что высокое содержание 9,12,15-18:3 и 7,10,13-16:3 в плазмалемме играет роль в формировании холодоустойчивости.

Перейдем теперь к детальному сравнению ЖК-состава цитоплазматических мембран, (см. табл. 2 столбцы 3 и 7). По результатам анализа видно, что содержание большого количества типов ЖК между двумя видами различается. Среди ЖК, содержание которых различно, есть как насыщенные, так и ненасыщенные. Так, достоверная разница показана для 12:0, 15:0, 16:0, 19:0, 20:0, 21:0, 22:0, 23:0, 25:0 ЖК. Среди ненасыщенных ЖК разница детектируется для 9-16:1, 7-16:1, 7,10-16:2, 7,10,13-16:3, 9-18:1, 9,12-18:2, 9,12,15-18:3. Таким образом, одинаковое содержание демонстрируют только 14:0, 14-16:1, 18:0, 24:0 ЖК (табл. 2). Важно также, что в плазматической мембране *S. lycopersicoides* наибольшее содержание показано для 9,12,15-18:3 ЖК (почти 38%), тогда как у тепличного *S. lycopersicum* преобладает 16:0 ЖК (так же почти 38%).

Результаты ЖК-анализа позволили сделать сравнения двух типов – сравнить состав ПМ двух видов между собой, а также сравнить между собой разные мембранные органеллы внутри одного вида. При сравнении ПМ показано достаточно большое различие в их составе между видами. Мембрана перуанского *S. lycopersicoides* более богата моноеновыми и триеновыми кислотами по сравнению мембраной тепличного *S. lycopersicum*, но уступает ей по содержанию насыщенных и диеновых. Все это результирует в более высоких показателях индекса ненасыщенности (ИН) для *S. lycopersicoides.* Отсюда можно было бы предположить большую текучесть мембран перуанского вида по сравнению с тепличным в контрольных условиях (+25 °C), однако

как нам показывают результаты ЭПР, при этой температуре мембрана тепличного вида оказывается более текучей (на рис. 5 значение $\Delta H_{макс}$ при +25 °C у тепличного меньше). Это противоречие может быть объяснено разницей в содержании белка, а также содержанием стеринов в мембране. Такие результаты, когда изменения ИН не отражал реальные изменения текучести известны. Показано, что при адаптации к холоду растения увеличивают ненасыщенность липидов, но текучесть может не меняться из-за компенсаторного увеличения фитостеролов. Наибольший интерес в этой части исследования представляют результаты сравнения разных фракций внутри вида, которые показывают, что схожесть мембран разных органелл между собой выше для перуанского томата. Органеллы тепличного отличаются друг от друга достаточно сильно. В данном факте можно усмотреть общую закономерность, характерную для видов, сталкивающихся с необходимостью адаптации к стрессовым условиям, — отказ от узкой специализации в пользу более унифицированной организации, что позволяет быстрее перенастраивать функционирование различных систем в изменяющихся условиях. Еще одним крайне важным наблюдением является содержание альфа-линоленовой 9,12,15-18:3 кислоты. У *S. lycopersicum* эта ЖК преобладает в мембране тилакоидов, и её значительно меньше в плазмалемме и других клеточных мембранах. Тогда как у *S. lycopersicoides* количество 9,12,15-18:3 ЖК высоко во всех трех типах мембран. ЖК 9,12,15-18:3 имеет высокую ненасыщенность и поэтому играет главенствующую роль в разжижении мембран при понижении температуры, предотвращая их затвердевание. К тому же эта ЖК доминирует в составе основных липидов плазматической мембраны - фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина. Было неоднократно показано, что данная ЖК превосходит по содержанию другие ЖК в мембранах холодоустойчивых растений, а ее накопление при холодовой акклиматизации является одним из ключевых механизмов выживания при стрессе (Tovuu et al. 2016; Kodama et al., 1994). Помимо своей структурной функции в мембранах 9,12,15-18:3 жирная кислота является предшественником жасмоновой кислоты, которая способна активировать гены *CBFs* (Sharma et al., 2016). Таким образом, альфа-линоленовая кислота выполняет структурную функцию, поддерживая текучесть за счет высокой степени ненасыщенности, а также является субстратом для синтеза сигнальных молекул - жасмонатов, потенциирующих защитные реакции. Исходя из этих данных, можно предполагать, что большее содержание 9,12,15-18:3 ЖК во всех мембранных компартментах *S. lycopersicoides* является одной из основных составляющих его повышенной холодоустойчивости.

Сравнительное исследование вязкости плазматических мембран двух видов томата с помощью ЭПР. Для исследования физических свойств ПМ был использован метод спиновых зондов. В качестве липидорастворимого зонда, чувствительного к изменениям свойств его молекулярного окружения, был выбран 5-доксил-стеарат (5-ДС) (рис. 4А). Эта метка имеет парамагнитную группу >N-O$^{\bullet}$ и имеет возможность встраиваться в мембрану за счет наличия ацильного остатка. При наложении постоянного электромагнитного и переменного магнитного полей можно делать выводы о подвижности метки в мембране, которая зависит от вязкости. Чем более вязкая мембрана, тем меньше подвижность метки. Необходимо еще раз отметить, что ЭПР исследование проводилось с использованием препаратов чистых выделенных ПМ, то есть оценивалось изменение текучести, вызванное исключительно физическим фактором понижения

температуры. Биологический вклад в изменение текучести в данной системе отсутствует, поскольку отсутствуют клеточные структуры.

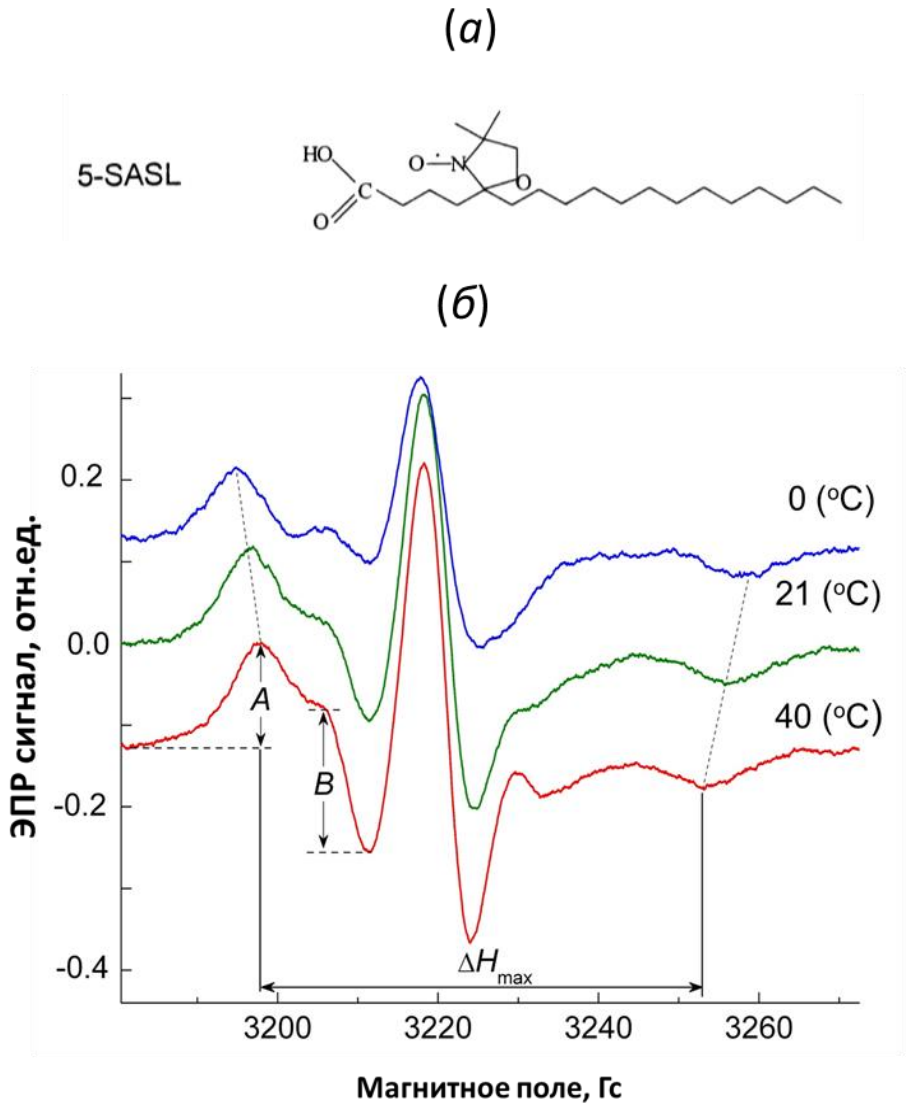

Рис. 4 — (А) Молекула 5-доксил-стеарата, липидорастворимого зонда, используемого при проведении ЭПР. (Б) Влияние температуры на спектр ЭПР зонда (5-доксил стеарат), встроенного в плазматическую мембрану томата *S. lycopersicoides*. С понижением температуры текучесть ПМ снижается (вязкость увеличивается), это результирует в снижении подвижности метки и увеличении параметра $\Delta H_{макс.}$

На рисунке 4Б показаны спектры ЭПР зонда 5-ДС, встроенного в клеточную мембрану холодолюбивого вида томатов, записанные при трех температурах. Приведенные спектры (сигнал ЭПР) – это первая производная спектра поглощения СВЧ, записанная с помощью спектрометра модели Е-4 фирмы «Вариан». Подобно спектрам, регистрируемым для других липидных мембран, с повышением температуры мы наблюдали изменения формы спектра, которые свидетельствуют об увеличении подвижность зонда в мембране. Главным характеристическим параметром является $\Delta H_{макс}$ - чем больше этот параметр, то есть чем шире расстояние между крайними пиками, тем жестче мембрана, и, наоборот, уменьшение расстояния между пиками свидетельствует о

большей текучести мембраны. Неоднократно показано, что параметр $\Delta H_{макс}$ может служить надежной адекватной характеристикой подвижности зонда в мембране.

В работе регистрировали спектры в процессе холодового воздействия на препарат цитоплазматических мембран двух исследуемых видов. По результатам были получены зависимости $\Delta H_{макс}$ от температуры, приведенные на рисунке. 5.

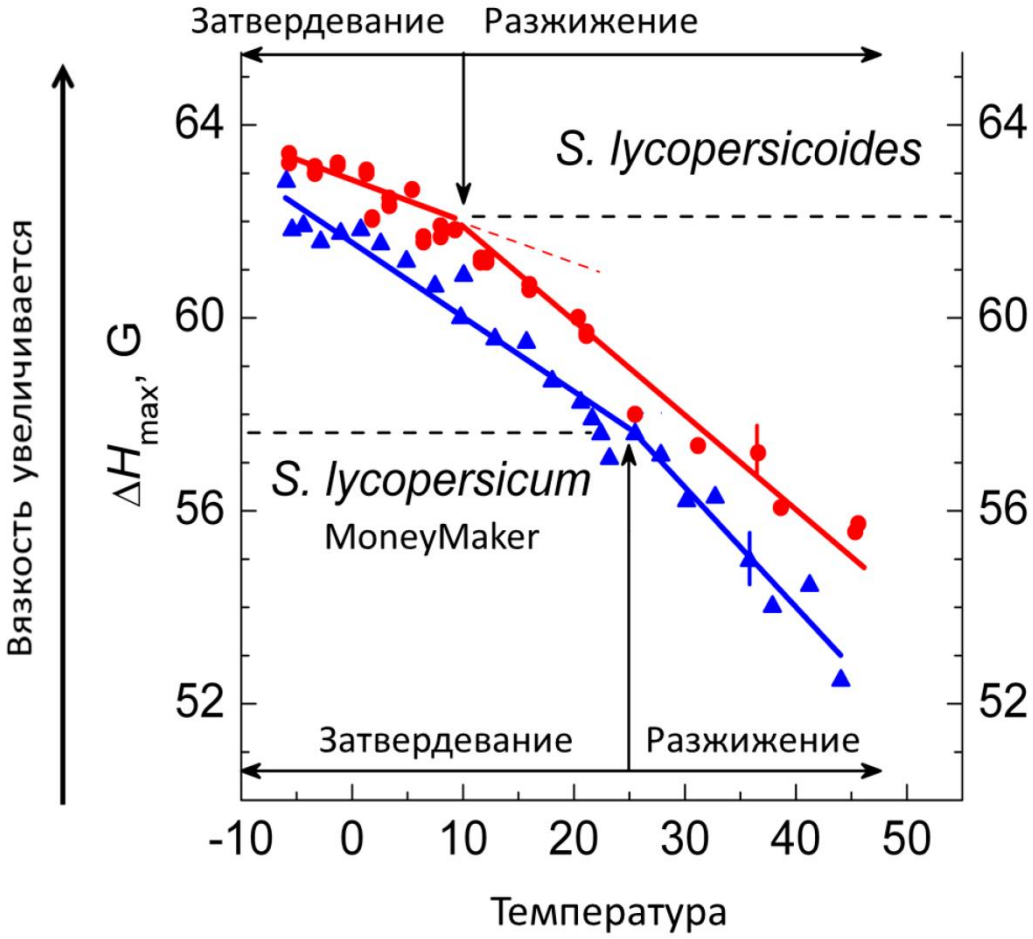

Рис. 5 — Температурные зависимости параметра $\Delta H_{макс}$, измеренные на плазматических мембранах теплолюбивого (*S. lycopersicum*) и холодоустойчивого (*S. lycopersicoides*) видов томатов

Полученные температурные зависимости параметра $\Delta H_{макс}$ заметно различаются. Важным фактом в данных результатах является то, что характерные «изломы» прямых аппроксимации у холодоустойчивого и теплолюбивого вида соответствуют температурам их произрастания в природе - около +10 ºС и +25-30 ºС.

Наиболее интересный результат, это тот факт, что углы наклона прямых аппроксимации для перуанского вида *S. lycopersicoides* меньше по сравнению с углами наклона прямых теплолюбивого вида *S. lycopersicum*. Иными словами, холодостойкий томат дольше сохраняет «оптимальное» состояние мембраны при изменении температуры относительно природной температурной нормы (+10 °С). У холодостойкого томата и затвердевание, и разжижение идут медленнее по сравнению с теплолюбивым видом. То

есть, можно говорить, что «буферная емкость» текучести его ПМ больше, чем у теплолюбивого. Для теплолюбивого томата при отклонении значений от оптимальной температуры (+25 °С) наблюдается резкое уплотнение (при понижении температуры) и резкое разжижение мембран (при повышении температуры), что отражается в большем угле наклона кривых, по сравнению с таковыми для перуанского вида. Иными словами, в области оптимальной температуры роста для каждого из томатов необходимы разные диапазоны изменения температур для изменения текучести мембран, соответствующих разнице в 1 G на ЭПР-спектрах. Так, для перуанского томата в области температурной нормы (+10 °С) для изменения $\Delta H_{макс}$ на 1 G необходимо приложить разницу в 14 °С, тогда как для тепличного томата в для изменения $\Delta H_{макс}$ на 1 G в области температурной нормы (+25 °С) нужно всего лишь 6 °С.

Следует подчеркнуть, что метод ЭПР обладает высокой информативностью при анализе влияния липидного состава на физические свойства мембран и широко используется в биофизике мембран. Изменения степени ненасыщенности жирных кислот, содержания стеролов или фосфолипидных классов находят прямое отражение в параметрах ЭПР-спектров. Таким образом, ЭПР служит связующим звеном между биохимическим составом мембран и их физическим состоянием (Yeagle, 1993). Так, в работах Тихонова с соавт. сравнивались температурные зависимости параметра $\Delta H_{макс}$ для молекул зонда, встроенных в тилакоидные мембраны двух видов рода *Cucumis*, огурца и дыни. Авторы выращивали огурец и дыню при температуре +25 °С, а затем сравнивали, как изменяется текучесть тилакоидных мембран в зависимости от температуры. На полученных ими зависимостях были обнаружены изломы. Температура, при которой они наблюдались, четко соответствовала оптимальной температуре роста этих видов. Главными результатами в этой работе являются, во-первых, наличие изломов на прямых зависимостей $\Delta H_{макс}$ от температуры (рис. 5) и во-вторых, разные скорости изменения вязкости при понижении температуры относительно оптимальной. В данном случае результаты аналогичны результатам Тихонова с соавт. – на кривых зависимостей текучести цитоплазматической мембраны от температуры изломы наблюдаются при тех значениях, при которых растение растет в естественных условиях. Второй результат является основным и показывает, что мембрана перуанского томата *S. lycopersicoides* действительно в определённом диапазоне температур (относительно естественного оптимума) способна поддерживать оптимальную текучесть. И этот диапазон шире у перуанского вида, чем у тепличного вида, мембрана которого резко изменяет свою вязкость при относительно небольшом понижении температуры. Таким образом, можно говорить, что «буферная емкость» параметра текучести ПМ у перуанского вида *S.lycopersicoides* больше, чем у теплолюбивого *S.lycopersicum*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью работы было выяснить возможную связь текучести плазматической мембраны и первичной чувствительности высших растений (томата) к низкотемпературному стрессу. Мы выдвинули гипотезу, что текучесть плазматической мембраны может служить компонентом первичного восприятия холодового стресса у высших растений по аналогии с таковым механизмом, открытым для цианобактерий. Исходя из выдвинутой гипотезы, исследование имело целью ответить на вопрос: будет ли мембрана устойчивого к холоду вида дольше сохранять текучесть при понижении температуры? Доказав

контрастность двух видов томатов в отношении холода, нами было проведено исследование текучести цитоплазматических мембран этих видов в зависимости от температуры. Основными результатами данной работы, во-первых, являются выявленные изломы на прямых зависимостей текучести от температуры, соответствующие оптимальным температурам роста видов, а во-вторых — различия в скоростях изменения вязкости при снижении температуры. Второй результат является ключевым в данной работе и свидетельствует о том, что мембрана перуанского томата способна сохранять оптимальную текучесть в определённом диапазоне температур относительно природного оптимума. При этом данный диапазон у перуанского вида шире, чем у тепличного томата, мембрана которого резко изменяет вязкость уже при незначительном понижении температуры. Иначе говоря, «буферная ёмкость» параметра текучести плазматической мембраны у перуанского холодоустойчивого вида выше, чем у теплолюбивого. Ответить на вопрос, поставленный в начале исследования можно таким образом: при понижении температуры ниже той, которая является естественным оптимумом, холодостойкий вид сохраняет текучесть ПМ дольше, чем теплолюбивый. Иными словами, есть взаимосвязь между сохранением текучести и невосприимчивостью к холоду.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии устойчивой связи между физическим состоянием плазматической мембраны и чувствительностью растений к холодовому стрессу. Сохранение текучести мембраны при понижении температуры может рассматриваться как один из ключевых факторов, обеспечивающих устойчивость клеточных структур и эффективное функционирование сигнальных и метаболических систем в условиях низких положительных температур. Полученные данные согласуются с гипотезой о важной роли свойств ПМ в ранних этапах холодового ответа у высших растений и расширяют представления о мембране как о значимом элементе первичного восприятия физического воздействия температуры и клеточных регуляторных процессов.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют в пользу высказанного ранее предположение о том, что изменение текучести ПМ может прямое отношение к восприятию холодового стресса у высших растений по аналогии с таковым у цианобактерий.

В дополнение к этому, сравнительный анализ липидного состава мембранных фракций выявил принципиальные различия между контрастными генотипами. У тепличного MoneyMaker жирнокислотные профили плазматической мембраны, тилакоидов и мембран внутриклеточных органелл существенно различались, что отражает высокую степень мембранной специализации. Такая «типизация» мембран может обеспечивать эффективность функционирования при оптимальных температурах, но снижает устойчивость при резких температурных колебаниях. У перуанского *S. lycopersicoides* различия между мембранными компартментами были значительно менее выражены. Высокое содержание α-линоленовой кислоты характерно не только для тилакоидных мембран, но и для плазматической мембраны, что, по-видимому, обеспечивает повышенную пластичность и устойчивость мембран в целом. Данный тип организации мембран может рассматриваться как один из ключевых факторов холодоустойчивости.

ВЫВОДЫ

1. На основании комплексной оценки холодового повреждения, включающей измерение утечки электролитов и эффективного квантового выхода фотосистемы II (Y(II)), показано, что дикий вид *S. lycopersicoides* характеризуется более высокой устойчивостью к низким положительным температурам по сравнению с культурным видом *S. lycopersicum* (сорт MoneyMaker), тогда как сорт Micro-Tom занимает промежуточное положение по уровню холодоустойчивости.
2. Холодоустойчивый вид *S. lycopersicoides* отличается специфическим изменением уровней транскриптов генов семейства *CBF*, проявляющимся в повышенном уровне транскриптов *CBF3* и пониженном уровне *CBF1* по сравнению с сортами тепличного вида *S. lycopersicum* (MoneyMaker и Micro-Tom), что указывает на различия в регуляции *CBF*-зависимого холодового ответа между сравниваемыми генотипами.
3. В фазе восстановления после холодового стресса у *S. lycopersicoides* и сорта Micro-Tom наблюдается повышение уровня транскриптов генов *CBFs*, тогда как у сорта MoneyMaker повышенный уровень транскриптов данных генов в период восстановления не выявляется, что свидетельствует о различиях в постстрессовой регуляции холодового ответа у исследованных генотипов.
4. Анализ временной динамики изменений тотального жирнокислотного состава клеток листьев при холодовом воздействии показал отсутствие выраженных перестроек у *S. lycopersicoides* и сорта MoneyMaker, тогда как у сорта Micro-Tom выявлены изменения содержания жирных кислот 7,10,13-16:3, 18:0 и 9-18:1, направленные на сближение показателей с таковыми у холодоустойчивого вида *S. lycopersicoides*, что может отражать частичную адаптационную перестройку липидного метаболизма в ответ на холодовой стресс.
5. На основании совокупности физиологических и молекулярных показателей установлено, что среди трёх изученных генотипов наиболее холодоустойчивым видом является *S. lycopersicoides*, а наиболее холодочувствительным сортом - *S. lycopersicum* MoneyMaker.
6. *S. lycopersicoides* и сорт MoneyMaker существенно различаются по жирнокислотному составу плазматической мембраны. В частности, содержание полиненасыщенной жирной кислоты 9,12,15-18:3 в плазматической мембране *S. lycopersicoides* было значительно выше (37,9 ± 0,9) по сравнению с сортом MoneyMaker (16,9 ± 0,3). Кроме того, *S. lycopersicoides* характеризуется более однородным жирнокислотным составом между различными мембранными фракциями по сравнению с MoneyMaker, мембраны которого демонстрируют выраженную дифференциацию. Выявленная особенность может

рассматриваться как адаптивное свойство, обеспечивающее более быструю перестройку мембранных систем при изменении условий среды, включая температурный фактор.

7. При понижении температуры ниже оптимальной *S. lycopersicoides* сохраняет текучесть плазматической мембраны в более широком интервале температур, чем MoneyMaker, что подтверждает высказанную нами ранее идею, согласно которой изменение текучести плазматической мембраны может иметь прямое отношение к восприятию холодового стресса высшими растениями по аналогии с цианобактериями.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. **Milovskaya, I.**, 2024. Molecular mechanisms of plant responses to cold stress. Russian Journal of Plant Physiology 71, 200.
2. **Milovskaya, I**., Voronkov, A., Ivanova, T., Kuznetsov, V., Pashkovskiy, P., 2025. Cold Tolerance Differences Between the Widely Used Model *S. lycopersicum* Cultivars and the Wild Species S. *lycopersicoides*: Role of Fatty Acid Profile and CBF Genes. Horticulturae, 11, 1342.
3. **Milovskaya, I**., Trubitsin, B., Voronkov, A., Ivanova, T., Piotrovskii, M., Trofimova, M., Kuznetsov V., Tikhonov A., Pashkovskiy, P., 2025. Plasma membrane fluidity as a potential sensor of cold stress in plants: insights from comparing cold-tolerant and cold-sensitive tomato species. Plant Physiology and Biochemistry, 110943.

Публикации в сборниках конференций

1. Миловская И.Г., Воронков А.С., Иванова Т.В., Пиотровский М.С., Тихонов А.Н., Трубицин Б.В., Трофимова М.С., Кузнецов Вл.В., Пашковский П.П., 2025. Холодоустойчивость *Solanum lycopersicoides* обусловлена альтернативным механизмом, ранее не выявленным в семействе *Solanaceae*. 28-я Пущинская школа-конференция молодых ученых с международным участием «Биология - наука XXI века».
2. Миловская И. Г., Тихонов А. Н., Трубицин Б. В., Воронков А. С., Иванова Т. В., Пиотровский М. С., Трофимова М. С., Кузнецов В. В., Пашковский П. П., 2025. Холодоустойчивость *Solanum lycopersicoides* обусловлена альтернативным механизмом, ранее не выявленным в семействе *Solanaceae*. Всероссийская научная конференция с международным участием и школа для молодых ученых «ЛИПИДЫ – 2025».