ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

ИМ. К.А. ТИМИРЯЗЕВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Миловская Ирина Георгиевна

Плазматическая мембрана как компонент первичного восприятия холодового стресса у растений томата

1.5.21. Физиология и биохимия растений

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к.б.н.

Пашковский Павел Павлович

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

Сокращения.....5

Введение.....7

Актуальность темы исследования.....7

Цель и задачи исследования.....9

Научная новизна.....10

Теоретическая и практическая значимость работы.....11

Методология диссертационного исследования.....11

Положения, выносимые на защиту.....11

Апробация работы.....12

Публикации по теме диссертации.....12

Обзор литературы.....13

1. Типы растений по устойчивости к холоду.....13

2. Молекулярные механизмы ответа на холодовой стресс: рецепция холода клеткой, запуск Ca^{2+}-сигнализации, активация пути *CBF* (C–box binding factor) - *COR* (cold-regulated gene).....20

3. Первичный сенсор холода у цианобактерий и параллель с первичным сенсором у высших растений.....32

4. Нарушение баланса накопления и расходования энергии при холодовом стрессе вызывает фотоингибирование фотосистемы II и включает механизмы защиты реакционнного центра фотосистемы II.....34

5. Стратегии повышения холодоустойчивости теплолюбивых растений.....35

6. Синтез жирных кислот в растительных клетках.....40

7. Роль фоторецепторов растений в восприятии температуры.....41

Материалы и методы.....46

1. Объекты исследования.....47

2. Воздействие низких температур.....47

3. Оценка фотохимической активности фотосистемы II.....47

4. Определение степени утечки электролитов.....48

5. Выделение фракций цитоплазматических мембран, тилакоидных мембран и мембран внутриклеточных органелл. 48

6. Оценка степени обогащения плазмалемной фракции плазматической мембраной методом определения активности маркерных ферментов. 51

7. Экстракция и дериватизация жирных кислот. 51

8. Газожидкостная хроматография–масс-спектрометрия (ГЖХ-МС). 52

9. Экстракция РНК и обратная транскрипция. 53

10. Анализ уровня транскриптов *CBF(C–box binding factor)*-генов. 53

11. Анализ текучести плазматической мембраны методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) 54

12. Статистический анализ. 55

Результаты 56

1. Визуальная оценка состояния растений по ходу эксперимента. 56

2. Оценка степени утечки электролитов. 58

3. Оценка степени повреждения фотосистемы II. 60

4. Анализ уровня транскриптов *CBF(C–box binding factor)*-генов. 61

5. Анализ тотального жирнокислотного состава листьев трех генотипов во временной динамике холодового воздействия. 63

6. Оценка степени обогащения мембранной фракции плазмалеммой методом определения активности маркерных ферментов. 66

7. Анализ жирнокислотного состава фракционированных органелл листьев у контрастных к холоду MoneyMaker и *S. lycopersicoides* в контрольных условиях. 68

8. Сравнительное исследование текучести мембран двух видов томата с помощью электронного парамагнитного резонанса. 73

Обсуждение 77

1. Обсуждение результатов первой части работы. 77

1.1. Анализ снижения флуоресценции хлорофилла и степени утечки электролитов. 77

1.2. Анализ содержания уровня транскриптов маркерных генов холодового ответа. 79

1.3. Анализ динамики изменений суммарного содержания жирных кислот в условиях холодового воздействия. 84

2. Заключение по первой части работы. 85

3. Обсуждение результатов второй части работы. 87

3.1. Анализ жирнокислотного состава плазматических мембран и других мембранных органелл контрастных видов в контрольных условиях. 87

3.2. Анализ текучести плазматических мембран контрастных по холодоустойчивости видов при постепенном снижении температуры. 89

Заключение....91

Выводы....93

Список литературы 95

СОКРАЩЕНИЯ

5-ДС – 5-доксил-стеарат

АГ – аппарат Гольджи

АПБ – ацилпереносящий белок

АТФ - аденозинтрифосфат

АФБ – антифризные белки

АФК – активные формы кислорода

БС – брассиностероиды

БТП – бис-трис-пропан, или 1,3-бис(трис(гидроксиметил)метиламино)пропан

ГБ – гиббереллины

ГЖХ-МС – газо-жидкостная хроматография с последующей масс-спектрометрией

ГЛБ – глицинбетаин

ГФАТ – глицерин-3-фосфатацилтрансфераза

ДТТ – дитиотрейтол

ЖК – жирная кислота

ЖКОДЦ – жирные кислоты с очень длинной цепью

ЖК-состав – жирнокислотный состав

ИН – индекс ненасыщенности

КМ – консервативный мотив

КФБ – калий-фосфатный буфер

МГДГ – моногалактозилдиацилглицерол

МЭЖК- метиловые эфиры жирных кислот

НАДН - никотинамидадениндинуклеотид восстановленный

НАДФН - никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный

ПВП – поливинилпирролидон

ПМ – плазматическая мембрана (плазмалемма)

ПЦР-РВ - полимеразная цепная реакция в реальном времени

ПЭГ – полиэтиленгликоль

РЦ – реакционный центр

ТФ – транскрипционный фактор

УЭ – утечка электролитов

ФГ - фосфатидилглицерин

ФК – фосфатидная кислота

ФС – фотосистема

ФХ – фосфатидилхолин

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс

ЭР – эндоплазматический ретикулум

CBF – C–box/DREB binding factor

COR gene – cold-regulated gene

CRLK1 – calmodulin-dependent receptor–like kinase 1

CRPK1 – cold-responsive protein kinase 1

dNTPs – 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты

FAD – fatty acid desaturase

LACS ─ long-chain fatty acyl-CoA synthetases

MAPK - mitogen-activated protein kinase

MCA – midl-complementing activity mechanosensitive channels (механочувствительный канал MCA)

MMLV RT ─ moloney murine leukemia virus reverse transcriptase

PMSF ─ phenylmethylsulfonyl fluoride

PP2Acs – protein phosphatase 2A

PQ – plastoquinone

RPL2 – ribosomal protein L2

SAMK ─ stress-activated MAP kinase

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Холодовой стресс является одним из основных абиотических стрессов, вызывающих значительные потери урожая. Данный тип воздействия существенно влияет на выживаемость и возможность географического распространения сельскохозяйственных культур. По оценкам экспертов, производительность сельского хозяйства в мире снижается примерно на 2 миллиарда долларов ежегодно по причине холодового воздействия (Joshi et al., 2018). С точки зрения сельского хозяйства, основными негативным последствиям холодового стресса являются плохая всхожесть и замедление роста растений. Для максимальной скорости роста культур, которая важна при планировании посевов, требуется оптимальная температура. Когда температура окружающей среды отклоняется от оптимальной, в растениях происходят физиологические, биохимические и молекулярные изменения, приводящие к остановке роста или гибели (Maleki et al., 2018). Воздействие холодового стресса на репродуктивную стадию растений задерживает всходы и приводит к стерильности пыльцы, что является одним из ключевых факторов, ответственных за снижение урожайности зерновых культур (цит. по Yadav et al., 2010).

Согласно распоряжению правительства РФ от 08.09.2022 N 2567-р (ред. от 23.11.2023) «Об утверждении Стратегии развития агропромышленного и рыбохозяйственного комплексов Российской Федерации на период до 2030 года» (https://sudact.ru/law/rasporiazhenie-pravitelstva-rf-ot-08092022-n-2567-r/) расширение посевов сельскохозяйственных культур за счет неиспользуемых пахотных земель определено в качестве основных приоритетов и целей государственной политики в сфере эффективного вовлечения в оборот земель сельскохозяйственного назначения Российской Федерации. Большая часть территорий нашей страны лежит в умеренном поясе, но из-за больших различий в температуре и влажности многие исследователи относят климат северной части умеренного пояса к субарктическому (https://www.koppen-map.com/). По этой причине создание сортов ценных сельскохозяйственных культур, устойчивых к холоду, входит в состав приоритетных исследовательских задач.

Для успешной реализации вышеуказанной цели, необходимо понимать механизмы, лежащие в основе ответа растения на холодовой стресс. Следует отметить, что низкотемпературный стресс подразделяют на стресс от низких положительных температур и стресс от отрицательных температур (Levitt J. 1980; 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 мы будем называть холодовым. Основное неблагоприятное воздействие холодового стресса на растения проявляется в повреждении мембран. Следствием этого являются незамедлительные нарушения процессов фотосинтеза и дыхания (Yadav et al., 2010). Остатки жирных кислот (ЖК) в мембранных липидах могут быть насыщенными или ненасыщенными. Ненасыщенные ЖК имеют одну или более двойных связей в структуре молекулы, тогда как атомы углерода в составе насыщенных ЖК имеют лишь одинарные связи. Ввиду наличия двойных связей молекулы ненасыщенных ЖК имеют изгибы в своей структуре, что мешает их уплотнению при понижении температуры. Липиды, содержащие большее количество насыщенных ЖК, уплотняются быстрее и при более высоких температурах, чем липиды, содержащие ненасыщенные ЖК. Таким образом, соотношение этих двух типов ЖК в липидах мембран определяет их текучесть. Текучесть мембраны является важнейшей характеристикой. При чрезмерном уплотнении мембранных липидов (ригнификации мембраны) нарушается функционирование белков, ионный транспорт и клеточный гомеостаз в целом. Помимо того, что мембраны являются ключевыми точками приложения повреждающего воздействия низких температур, выдвигается предположение, что они могут выступать и первичными рецепторами холодового воздействия. Так, в ряде работ показано, что химические вещества, которые либо повышают, либо уменьшают текучесть мембран, оказывают влияние на чувствительность растительных клеток к холодовому стрессу (Sangwan et al., 2002; Orvar et al., 2000). Важную роль мембранных липидов подтверждают и различные эксперименты, в которых оверэкспрессия генов белков, модифицирующих ЖК-состав мембран, приводила к изменению сопротивляемости низким температурам (Yu C. et al., 2009, Liu et al., 2013, Dominguez et al., 2010). Есть доказанная связь между степенью вязкости мембраны и восприимчивостью к низким температурам. Однако остаётся неясным, является ли процесс изменения текучести мембран частью первичного механизма восприятия холодового стресса или просто представляет собой один из множества адаптационных механизмов, происходящих в клетке в ответ на воздействие низких положительных температур.

На молекулярном уровне ключевую роль в формировании устойчивости к низким температурам у высших растений играют гены *COR* (cold-regulated), которые кодируют белки, обеспечивающие защитные реакции. Экспрессия этих генов индуцируется транскрипционными факторами семейства CBF (C-repeat binding factors) (Liu, et al., 2017, Shi et al., 2018). Для активация *CBF*, в свою очередь, требуется повышение 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 плазматической мембраны (ПМ). Однако механизмы, приводящие к открытию этих каналов при воздействии низких температур, до настоящего времени остаются неясными. Таким образом, при достаточно детальной характеристике молекулярных ответов высших растений на холодовое воздействие на уровне транскрипционных факторов (ТФ), механизмы первичного восприятия холода и ранние стадии передачи сигнала остаются изученными в значительно меньшей степени. 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. 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., 2000). Повышение мембранной вязкости влияет на конформационное состояние гистидинкиназы Hik33, что инициирует каскад фосфорилирования и запуск экспрессии генов, обеспечивающих холодоустойчивость (Los et al., 2000). 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 (C-box binding factor)* в качестве показателя восприимчивости растений к холодовому стрессу.

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 (ФС II)), 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 холоду.

Методология диссертационного исследования

Диссертационная работа выполнена с использованием физиологических, биохимических и молекулярных методов, анализа литературных данных.

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.

Апробация работы

По теме диссертации опубликовано 3 статьи в журналах, в том числе рекомендованных ВАК и включенных в Web of Science, результаты работы были представлены в виде устных докладов на 2 научных конференциях. 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.

Публикации по теме диссертации

1. **Milovskaya I.** Molecular mechanisms of plant responses to cold stress // Russian Journal of Plant Physiology. 2024. V. 71. Art. 200. https://doi.org/10.1134/S1021443724606086
2. **Milovskaya I.**, Voronkov A., Ivanova T., Kuznetsov V., Pashkovskiy P. 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. 2025. V. 11. Art. 1342. https://doi.org/10.3390/horticulturae11111342
3. **Milovskaya I.**, Trubitsin B., Voronkov A., Ivanova T., Piotrovskii M., Trofimova M., Kuznetsov V., Tikhonov A., Pashkovskiy P. 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. 2026. V. 230. Art. 110943. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2025.110943

Результаты работы были представлены в виде устных докладов на научных конференциях:

1. 28-Я Пущинская школа-конференция молодых ученых с международным участием «Биология - наука XXI века» (Пущино, 21–24 апреля 2025 года);
2. Всероссийская научная конференция с международным участием и школа для молодых ученых «Липиды-2025» (Петрозаводск, 8–12 сентября 2025 года).

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы состоит из нескольких частей. В первой части описываются физиологические и молекулярные различия между холодоустойчивыми и теплолюбивыми сортами и видами, также приведено описание генотипов томатов, используемых в работе. Вторая часть посвящена описанию молекулярных механизмов ответа растительной клетки на холодовой стресс; в ней описываются пути передачи сигнала и гены, активирующиеся при данном типе стресса. Третья часть описывает механизм первичной рецепции холодового стресса цианобактериями, на основе которого строится гипотеза данной работы о первичной рецепции низких температур растительными клетками. Четвертая часть содержит информацию об изменениях фотосинтетических процессов во время снижения температуры. В пятой части рассматриваются стратегии, используемые для повышения холодоустойчивости культурных растений. Шестая часть посвящена синтезу ЖК в клетках растений, седьмая - роли фоторецептров, которую они играют в косвенном восприятии температуры.

1. Типы растений по устойчивости к холоду.

Растения различаются по своей устойчивости к температурному фактору и в связи с этим разделяются на холодоустойчивые и холодочувствительные (Adhikari et al., 2022, Lukatkin et al., 2012.). Растения, произрастающие в зоне умеренного климата (например, ячмень (*Hordeum vulgare*)**,** овёс (*Avena sativa*)**,** лён (*Linum usitatissimum*)) способны расти в условиях, когда температура значительно ниже оптимума. Такие растения называют холодостойкими. Тропические и субтропические растения, наоборот, останавливаются в росте и испытывают серьёзные повреждения при температурах от 0 до +10 °C (кофе (*Coffea arabica*), хлопчатник (*Gossypium hirsutum*) огурец (*Cucumis sativus*)). Устойчивость к холоду у сортов одного вида также может быть различна (Genkel et al., 1966). Для характеристики холодостойкости растений используют понятие температурный минимум. Это температура, при которой останавливается рост растений. Для большой группы сельскохозяйственных растений её величина составляет +4 °C.

Растения из регионов с умеренным климатом устойчивы к похолоданию, хотя большинство из них не очень устойчивы к отрицательным температурам, но могут повысить эту устойчивость, подвергаясь воздействию низких положительных температур (процесс, известный как закаливание или холодовая акклиматизация). Напротив, растения тропического и субтропического происхождения, такие как рис (*Oryza sativa*), кукуруза (*Zea mays*), часто оказываются неспособны адаптироваться к холоду. Во время

закаливания происходят многочисленные физиологические и молекулярные изменения (Yadav et al., 2010, Maleki et al., 2018). Перепрограммирование экспрессии генов приводит к накоплению не только протекторных белков, но и ряда метаболитов, которые обладают защитным действием. Устойчивость к холодовому стрессу, проявляемая растениями умеренного климата, не является полностью конститутивной, и, по крайней мере частично, она развивается при воздействии низких температур (Jan et al., 2009).

Одним из ключевых неблагоприятных последствий воздействия холодового стресса является нарушение функции мембран. При понижении температуры ацильные остатки в мембранных липидах начинают располагаться близко друг к другу, происходит уплотнение мембраны и нарушение ее текучести. Вследствие этого, нарушается проницаемость мембраны, а также становится невозможным нормальное функционирование мембранных белков. Следствием этого является угнетение процессов фотосинтеза и дыхания. Выраженность изменений, происходящих с мембраной под действием низких положительных температур, зависит от содержания ненасыщенных жирных кислот (ЖК) в составе липидов (Zheng et al., 2021, Трунова, 2007). Изгибы молекул ненасыщенных ЖК предотвращают плотную компактизацию липидов при понижении температуры, и мембрана дольше остаётся в состоянии «золь». При воздействии холодового стресса растения перестраивают состав мембранных липидов в сторону увеличения доли ненасыщенных ЖК. Это показано в ряде работ (Li et al., 2015, Palta et al., 1993, Yu et al., 2009). Холодоустойчивость растений умеренного климата в значительной мере связана с преобладанием в жирах ненасыщенных ЖК (олеиновая, линолевая, линоленовая). У растений южного происхождения липиды в мембранах, наоборот, отличаются большим количеством насыщенных ЖК (пальмитиновая, стеариновая). В дополнение к степени ненасыщенности мембранных липидов, имеются данные, что асимметрия липидов (содержание различных типов фосфолипидов во внешнем и внутреннем мембранных слоях) также вносит вклад в состояние мембраны при низкой температуре (Gomès et al., 2000).

Растения, неустойчивые к холодовому стрессу, при воздействии низких температур характеризуются изменениями на метаболическом уровне – у них происходит разбалансировка процессов накопления и расходования энергии. Нарушение дыхания ведет к торможению реакций цикла Кребса. У большей части растений в условиях ослабленного дыхания и недостатка энергии подавляется поглотительная активность корней, что влечет за собой утрату тургора и увядание. Наиболее общими видимыми признаками повреждения теплолюбивых растений низкими температурами являются утрата тургора, белесая или буровато-оливковая окраски листьев, появление на них

некротических пятен. При продолжительном воздействии пониженной температуры наступает гибель теплолюбивых растений. Адаптация растений к низким положительным температурам обеспечивается различными генетически закрепленными механизмами. Как уже было сказано, устойчивые растения, по сравнению с неустойчивыми, отличаются большей долей полиненасыщенных ЖК в составе фосфолипидов мембран. Большое значение здесь имеют ферменты ацилтрансферазы и десатуразы, отвечающие за образование двойных связей в насыщенных жирных кислотах. Показано, что мутанты растений, у которых эти ферменты отсутствуют, не выдерживают действия пониженных температур (Chen et al., 2013; Tovuu et al., 2016). Устойчивость растений умеренного климата достигается также более широким температурным диапазоном работы ферментов, наличием генов синтеза протекторных соединений. Так, глицинбетаин (ГЛБ), являющийся осмопротекторным веществом, не синтезируется у ряда холодочувствительных культур. Например, шпинат (*Spinacia oleracea*) и пшеница (*Triticum aestivum*), являются естественными накопителями ГЛБ, тогда как томат в норме не накапливает данное соединение (Park et al., 2004). Внедрение ферментов биосинтеза ГЛБ в растения-неаккумуляторы может явиться перспективным подходом в создании холодоустойчивых растений (Karabudak et al., 2014).

У устойчивых растений при воздействии низких температур может повышаться активность альтернативного пути дыхания. При этом пути дыхания энергия в основном не аккумулируется в АТФ, а рассеивается в виде тепла (Armstrong et al., 2008). В результате повышается температура растительных тканей, а это имеет положительное значение для выживания растений в условиях низкотемпературного стресса. Также у устойчивых растений выше эффективность работы антиоксидантной системы (Maleki et al., 2018).

Одним из показателей устойчивости к холодовому стрессу является изменение ультраструктуры хлоропластов при воздействии низких положительных температур. Чем более чувствительно растение к низкотемпературному стрессу, тем быстрее и обширнее происходят ультраструктурные изменения. Wise с соавт. охарактеризовали холодовое (+5 °C) повреждение как 1) набухание хлоропластов, деформация и набухание тилакоидов, 2) уменьшение размера гранул крахмала и 3) образование небольших пузырьков вблизи хлоропластной мембраны, называемых периферическим ретикулумом (Wise et al., 1983, Kratsch et al., 2000). Набухание хлоропластов является следствием накопления осмолитов – продуктов разложения крахмала и фотоассимилятов. Амилазы хлоропластов устойчивы к холодовому воздействию, и благодаря этой устойчивости способствуют накоплению олигосахаридов при понижении температуры. Wise с соавт. в одной из работ исследовали три вида (листовая капуста (*Brassica oleracea*), фасоль (*Phaseolus vulgaris)*, хлопок

(*Gossypium hirsutum*)) с разной чувствительностью к холодовому стрессу и показали различную выраженность ультраструктурных изменений при воздействии холода. Наиболее чувствительные к низкотемпературному стрессу виды пострадали в течение 24 часов, причем реакцией стало полное разрушение оболочки хлоропласта. Менее чувствительное растение продемонстрировало реакцию в течение 144 часов, характеризующуюся набуханием хлоропластов. Наиболее устойчивый к низкотемпературному стрессу вид не проявлял признаков повреждения до тех пор, пока не подвергался длительному воздействию комбинированного стресса, но даже тогда пластиды оставались неповрежденными (Wise et al., 1983). На уровне клетки в целом устойчивость к низким температурам связана с увеличением объёма цитоплазмы и увеличением ее электронной плотности, что говорит о повышении концентрации растворенных веществ. Еще одна важная характеристика – это уменьшение объёма вакуоли (Трунова, 2007).

Также в различных источниках сообщается о роли липооксигеназ в ответе на температурный стресс. Данные ферменты катализируют перекисное окисление ненасыщенных ЖК и приводят к образованию оксилипинов, которые могут выполнять сигнальную функцию. В работе Lee с соавт. сравнивали экспрессию гена липооксигеназы (*LOX*) холодоустойчивого растения (тыквы фиголистной (*Cucurbita ficifolia*)) и растения, восприимчивого к холоду (огурца *Cucumis sativus*)) при воздействии температуры +6 °C. Авторы показали, что активность фермента увеличилась в корнях *C. ficifolia*, тогда как в корнях *C. sativus* повышение активности фермента не наблюдалось. Та же закономерность была выявлена и для транскрипции гена. Следовательно, активность липооксигеназы может играть важную роль в механизме устойчивости к низкотемпературному стрессу. Возможно, что активация данного белка и/или индукция экспрессии его гена могут быть характерны для устойчивых к низким температурам видов (Lee et al., 2005). О важности липооксигеназ в регуляции ответа на температурные стрессы говорит и исследование Kosakivska с соавт., проведенное на пшенице (*Triticum aestivum*) (Kosakivska et al., 2014). Активность липооксигеназ была увеличена у холодостойких сортов *T. aestivum* и в исследовании Nejadsadeghi с соавт. (Nejadsadeghi et al., 2015).

Исходный уровень чувствительности к холоду связан со способностью к холодовой акклиматизации. Предполагается, что холодоустойчивые виды способны в большей степени развить устойчивость и к отрицательным температурам в процессе закаливания. При этом некоторые восприимчивые к холоду виды также способны увеличить свою сопротивляемость в процессе закаливания, однако этот эффект будет менее выраженным по сравнению с эффективностью закаливания холодостойких растений. Эта же

закономерность проявляется и для сортов различной устойчивости. Ban с соавт. продемонстрировали, что растения как холодостойких, так и холодочувствительных сортов чая могут повысить свою устойчивость за счет закаливания. При этом у холодостойкого сорта развилась более высокая устойчивость, чем у холодочувствительного. Чтобы понять механизмы, лежащие в основе такой дифференциальной толерантности к холодовому стрессу, авторы исследовали различия между двумя сортами в физиологических и молекулярных процессах. Их результаты показали, что во время акклиматизации холодоустойчивый сорт демонстрировал более высокий уровень накопления растворимых сахаров, чем холодочувствительный. Также данный сорт отличался повышенной экспрессией важнейшего транскрипционного фактора холодового ответа *CBF1* (*C-box/DREB binding factor 1*) и его мишеней (например, генов дегидринов *DHNs*), что также способствует наблюдаемым различиям. Помимо этого, авторы показали, что экспрессия ряда генов (*CsSPS, CsRS2, CsINV5*), необходимых для метаболизма сахара повышается у холодоустойчивого сорта, но остаётся неизменной у холодочувствительного. Авторы полагают, что экспрессия этих генов может быть использована в качестве сортоспецифичного индикатора холодостойкости для селекции чая (Ban et al., 2015). Схожие результаты, показывающие связь между способностью к холодовой акклиматизации и способностью к накоплению сахаров показывают эксперименты с сортами люцерны (Zhang et al., 2011). Возможности оказать сопротивление температурному стрессу связана со стадией развития, на которой находится растение. Растения в генеративной фазе могут оказаться неспособны к адаптации. Помимо этого адаптационные способности варьируют и между органами. Показано, что иногда в отличие от клеток листа, клетки корня не способны к ощутимой температурной адаптации (Popov et al., 2010).

О роли дегидринов в переносимости холода сообщается в работе Eriksson с соавт. Результаты работы ученых показывают, что белок семейства дегидринов способен взаимодействовать с фосфатидилхолином, фосфатидилглицерином, фосфатидилсерином и фосфатидной кислотой. При таком взаимодействии снижается температура фазового перехода липидов мембран, что согласуется с предполагаемой ролью дегидринов в придании растению устойчивости к холоду (Eriksson et al., 2011). Повышенный уровень дегидринов характерен для некоторых устойчивых к холоду растений.

Таким образом, различия между холодоустойчивыми и холодочувствительными видами состоят в способности изменять жирнокислотный состав мембранных липидов под действием холода, в интенсивности накопления сахаров и способности к накоплению ряда криопротекторов (пролина, ГЛБ, дегидринов), в способности противостоять

окислительному стрессу. Вышеперечисленные метаболические и генетические особенности приводят к наблюдаемым различиям в структуре хлоропластов, митохондрий и цитоскелета при воздействии холода у холодочувствительных и холодоустойчивых видов. Различия между холодоустойчивыми и холодочувствительными растениями также состоят в особенностях гормональной регуляции холодового ответа и эпигенетических механизмах устойчивости к низким температурам (Eremina et al., 2016, Huo et al., 2022, Jha et al., 2023).

Дикорастущие близкородственные виды сельскохозяйственных культур часто оказываются более приспособленными к неблагоприятным условиям внешней среды. Понимание механизмов их повышенной резистентности расширяет фундаментальные знания и позволяет совершенствовать стратегии, применяемые для повышения устойчивости теплолюбивых растений к холоду. В данной работе исследуются два вида растений рода паслен: *Solanum lycopersicum* и *Solanum lycopersicoides.* Морфологические признаки *S. lycopersicoides*, сходны с таковыми у *S. lycopersicum*, которые в совокупности отличают их от большинства других видов пасленовых (Knapp et al., 2016). Среди данных признаков выделяют следующие: желтые венчики, сочленяющиеся у цветоножки, перисто-сегментированные листья и отсутствие клубней (цит. по Knapp et al., 2016). Оба вида являются диплоидами (2n = 24). С использованием специальных методов были выведены интрогрессивные линии между *S. lycopersicoides* и *S. lycopersicum*. В отличие от тепличного одомашненного *S. lycopersicum*, его дикий родственник *S. lycopersicoides* встречается на больших высотах в южной части Перу и на севере Чили. Перуанский томат растет в горах на высоте 3000 м при температуре + 10 °C, тогда как для тепличного томата оптимум составляет +27 °C. Плоды *S. lycopersicoides* при созревании имеют черную окраску. Если говорить о различиях между культивируемыми и дикими томатами в целом, следует отметить следующее. При сравнении экспрессии генов дикорастущих и одомашненных томатов, различия выявлены в экспрессии генов различных ферментов, в частности, в зависимости от типа ткани от 10 до 16 % различий приходится на разницу в экспрессии генов оксидоредуктаз. Также различается состав обнаруженных длинных нкРНК. В целом, дикие виды томата характеризуют как более устойчивые к соли и засухе, а характерными особенностями культурного томата являются крупные плоды и большее содержание питательных веществ. Также к признакам, отличающим культурные растения от диких, относят более компактную форму, повышенную скороспелость, уменьшение/отсутствие периода покоя семян (Kumar et al., 2019). В ответ на разные типы стресса транскриптомные и метаболомные изменения более выражены у культивируемых томатов (Reimer et al., 2021). Характерной особенностью *S. lycopersicoides* является

высокий уровень устойчивости к патогенам *Botrytis cinerea* и *Alternaria solani* (Smith, et al., 2014).

Как отмечалось выше, различные сорта одного вида могут отличаться по устойчивости к холоду. Данная работа сравнивает не только два вида томата между собой, но также объектами являются еще и два сорта одомашенного томата *S. lycopersicum* - Micro-Tom и MoneyMaker. Данные сорта тепличного вида часто используются в экспериментальных работах. Нам было интересно охарактеризовать их по холодочувствительности для понимания возможности использования в качестве модельных объектов при изучении данного типа стресса. Одной из особенностей Micro-Tom является частичное нарушение синтеза брассиностероидов. Брассиностероиды (БС) являются стероидными гормонами растений, необходимыми для нормального роста и развития. Мутанты по генам биосинтеза или рецепции данных гормонов часто характеризуются карликовым фенотипом. Ген *DWARF* (*D*) томатов кодирует фермент цитохром Р450, который катализирует процесс окисления на двух стадиях биосинтеза БС. (Bishop et al., 1999). Мутация гена *D* у растений сорта Micro-Tom обуславливает темно-зеленый цвет и характерную морщинистость листьев, что связано с нарушением синтеза БС. Micro-Tom также несет мутацию, приводящую к уменьшению длины междоузлия. Важно отметить, что усеченность междоузлия и карликовость, не связаны с уровнем активных гиббереллинов, которые также как и БС, являются гормонами, регулирующими рост (Martí et al., 2006). Также, несмотря на мутацию *d* и карликовый фенотип, уровень БС у Micro-Tom все же поддерживается на уровне, необходимом для реализации основных процессов жизнеобеспечения. Более того, на данном сорте успешно проводятся исследования гормонального сигналинга (Campos et al., 2010). Другой мутацией, характерной для Micro-Tom, является мутация гена *SELF-PRUNING* (*SP*), которая также способствует карликовости. Помимо этого, показано, что Micro-Tom содержит два локуса, определяющих устойчивость к патогену *Cladosporium fulvum*. Единственной особенностью сорта MoneyMaker называют аллельные вариации в локусе количественных признаков, ответственные за размер плодов. Благодаря этому плоды MoneyMaker характеризуются большим размером, по сравнению с плодами дикорастущих томатов (Campos et al., 2010).

Таким образом, описанные генотипы могут быть использованы в экспериментах по анализу стресса от низкой положительной температуры. Их реакция на абиотический стресс может оказаться важной для расширения знаний о механизмах рецепции холодового стресса, а также для их характеристики в целом, поскольку генотипы *S.*

lycopersicum используются в экспериментах самых разных типов, а перуанский *S. lycopersicoides* является близким родственником тепличного томата, но в естественных условиях легко переносит низкие положительные температуры (Milovskaya, 2024).

2. Молекулярные механизмы ответа на холодовой стресс: рецепция холода клеткой, запуск Ca2+-сигнализации, активация пути *CBF* (C–box binding factor) - *COR* (cold-regulated gene).

2.1. Рецепция холода может быть связана с изменением текучести плазматической мембраны, реорганизацией цитоскелета и активацией Ca^{2+}-каналов плазмалеммы.

О роли плазматической мембраны (ПМ) в рецепции холодового воздействия было сообщено в исследованиях, проведенных на сине-зеленых 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. Данное повышение вязкости оказывает влияние на конформацию белка гистидинкиназы Hik33, что приводит к активации каскада фосфорилирования и индукции экспрессии генов холодоустойчивости, среди которых есть гены десатураз ЖК (Los et al., 2000). Вероятно, текучесть мембран может выполнять ту же функцию и у высших растений. Так, химические вещества, которые либо повышают, либо уменьшают текучесть мембран, оказывают прогнозируемое влияние на чувствительность к холоду. Было показано, что бензиловый спирт разжижает мембраны и одновременно формирует невосприимчивость к холодовому стрессу, тогда как диметилсульфоксид (ДМСО) придает мембранам жесткость и, таким образом, действует как "имитатор холодового стресса", запуская экспрессию генов холодового ответа в отсутствие холодового воздействия (Orvar et al., 2000). В этой же работе было продемонстрировано, что ответы клеток на низкотемпературный стресс предотвращаются воздействием джасплакинолида (стабилизатор актиновых микрофиламентов), но индуцируются при 25°C с помощью дестабилизатора актиновых микрофиламентов цитохалазина D. Данные результаты указывают на то, что реорганизация цитоскелета является неотъемлемым компонентом низкотемпературной передачи сигнала. Ещё одна работа, подтверждающая связь текучести мембран, организации актиновых микрофиламентов, Ca^{2+}-сигнализации и белков MAPKs (mitogen-activated protein kinase) в ответе на холодовой стресс сделана в группе профессора Dhindsa. Ученые показали, что активация в ответ на холод специфической растительной MAPK – SAMK, происходит при условии повышения вязкости мембраны и при повышении цитозольной концентрации Ca^{2+}. В проведенных экспериментах, активация

SAMK предотвращалась путем нарушения притока внеклеточного кальция и добавлением блокаторов кальций-зависимых протеинкиназ. В добавление к вышеуказанному была подтверждена роль цитоскелета в передачи информации о состоянии мембран к нижележащим участникам ответа на стресс. Авторы показали, что холодовая сигнализация может быть запущена и при 25°C при воздействии дестабилизаторами микрофиламентов и микротрубочек (Sangwan et al., 2002). Wang с соавторами на культуре клеток винограда показали, что в течение 30 мин после воздействия холода в клетках происходит дестабилизация микротрубочек, которая связана ригнификацией мембраны и поступлением Ca^{2+} в клетку (Wang et al., 2017). В ряде работ изучалось влияние различных десатураз жирных кислот на восприимчивость растений к холоду. Было показано, что синтез олеиновой и линолевой ЖК (18:2 и 18:3) крайне важен для регулирования вязкости мембраны. Так, *FAD2 (fatty acid desaturase 2*)-мутанты демонстрировали нарушение способности регулировать вязкость мембраны при понижении температуры и оказывались чувствительны к холодовому воздействию (Martinière et al., 2011). Yu et al. продемонстрировали, что избыточная экспрессия гена омега-3 десатуразы ЖК томатов (*LeFAD3*), локализованной в эндоплазматическом ретикулуме, приводила к толерантности трансгенных растений к холодовому стрессу за счет повышенного содержания линоленовой кислоты (18:3) (Yu et al., 2009).

2.2. Состав мембранных липидов хлоропластов играет роль в устойчивости к холоду.

На физиологическом уровне наиболее быстрой реакцией на низкие температуры является фотоингибирование фотосистемы II (ФС II). Интересно, что один из механизмов защиты от фотоингибирования связан с наличием ненасщенных ЖК в мембране. Подтверждением важнейшей роли именно хлоропластных мембран в развитии ответа на воздействие низких температур являются эксперименты с оверэкспрессией десатуразных генов с разной локализацией белковых продуктов (Dominguez et al., 2010). Dominguez с коллегами показали, что оверэкспрессия генов *FAD3* и *FAD7* десатураз в растениях томатов приводит к улучшению сопротивляемости холодовому стрессу. При этом авторами выявлена особенная роль десатуразы хлоропластов FAD7 в установлении толерантности к холоду. Похожие результаты при экспрессии *leFAD7* были получены Liu et al. Авторы показали толерантность трансгенных *leFAD7*-экспрессирующих томатов к низким температурам (Liu et al., 2013).

В дополнение к имеющимся данным о роли степени насыщенности ЖК мембранных липидов следует отметить роль глицерин-3-фосфатацилтрансферазы в

регуляции синтеза мембранных липидов хлоропластов. Фосфатидилглицерин (ФГ) является единственным фософлипидом мембран хлоропластов и играет важную роль в организации белковых молекул комплексов ФС I и II (Wada et al., 2009). Глицерин-3-фосфатацилтрансфераза (ГФАТ) катализирует первую стадию биосинтеза ФГ путем переноса ацильной группы от ацил-АПБ в sn-1 положение глицерин-3-фосфата с образованием 1-ацилглицерин-3-фосфата. У растений, устойчивых к воздействию низких температур данный фермент предпочтительно использует в качестве субстрата 18:1-АПБ, что результирует в образовании 1-ацилглицерин-3-фосфата, sn-1 положение которого занимает ненасыщенная ЖК. У холодочувствительных растений ГФАТ не избирательны в отношении 18:1-АПБ и 16:0-АПБ и sn-1 и sn-2 положения ГФ часто оказываются занятыми несыщенной ЖК 16:0 (Sui et al., 2007). Группа китайских исследователей показала, что оверэкспрессия гена ГФАТ приводит к усилению сопротивляемости холодовому воздействию и повышению устойчивости фотосинтетического аппарата (Sui et al., 2007).

2..3. Повышение цитозольной концентрации Ca^{2+} является ключевым ответом клетки на понижение температуры и активирует ряд различных сигнальных путей.

Мессенджерами, чья роль в передачи сигнала о пониженной температуре на данный момент доказана, являются ионы Ca^{2+}. Были обнаружены механочувствительные Ca^{2+} каналы плазматической мембраны MCA1 и MCA2, вовлеченные в индуцированное холодом увеличение цитоплазматической концентрации Ca^{2+} у *Arabidopsis thaliana*. Также было показано, что кальциевая сигнализация, запускаемая с участием данных каналов при низких температурах, способствует развитию толерантности к холоду (Mori et al., 2018). Интересен тот факт, что в составе MCA1 и MCA2 присутствует домен EF-руки, что говорит о том, что эти белки не только являются каналами, проницаемыми для Ca^{2+}, но и сами могут регулироваться этим ионом.

В настоящее время рассматриваются разные способы запуска Ca^{2+}-сигнализации в клетках. Предполагается, что это может происходить через упомянутые выше механочувствительные каналы, а также с участием G-белков. Сообщается о трансмембранном белке COLD1 риса (*Oryza sativa)* (Ding et al., 2020), который меняет свою конформацию при низких температурах, а также взаимодействует с α-субъединицей G-белка (RGA1). Показаны взаимосвязи изменений этого взаимодействия с уровнем цитозольного кальция, однако точный механизм не установлен (Manishankar et al., 2015).

Таким образом, имеются данные о существовании Ca^{2+} каналов плазматической, а также и вакуолярной (Knight et al., 1996) мембран, активация которых в ответ на

холодовой стресс приводит к запуску Ca^{2+}-сигнализации. Неоднократно показано, что при воздействии низких положительных температур уровень внутриклеточной концентрации Ca^{2+} повышается (Plieth et al., 1999, Knight et al., 1991, Wang et al., 2019). Очень важно, что растение обладает чувствительностью не только к абсолютному значению температуры, но и к скорости её понижения. От того, насколько быстро происходит понижение температуры, зависит амплитуда повышения цитозольной концентрации Ca^{2+}: растения, подвергнутые более быстрому режиму охлаждения, демонстрируют повышенное содержание кальция по сравнению с растениями, подвергнутыми охлаждению до той же температуры, но за больший период времени. Зависимость между скоростью охлаждения и величиной повышения содержания кальция приблизительно линейная (Plieth et al., 1999).

Также связанным с этим наблюдением является тот факт, что кальциевая сигнализация связана с устойчивостью предобработанных низкой температурой растений к новым актам охлаждения (Knight et al., 1996). Когда растения последовательно подвергают воздействию одинаковых режимов охлаждения, кальциевая сигнализация ослабевает. Это очень похоже на механизм аккомодации в нервной системе. В определенный момент растение перестает быть чувствительным к холодовому воздействию с точки зрения выработки кальциевого сигнала. Эту десенсибилизацию можно преодолеть еще большим снижением температуры. Таким образом, хотя скорость охлаждения является наиболее важным параметром, абсолютная температура действительно обладает способностью повышать чувствительность системы. Так, если снижать температуру с +20 °C до +10 °C или с +10 °C до 0 °C с одинаковой скоростью, отклик Ca^{2+}-сигнализации в случае «+10 °C – 0 °C» будет амплитуднее, чем в случае «+20°C – +10 °C» (Knight et al., 2002) Таким образом, достоверно показано, что повышение цитозольного уровня Ca^{2+} в ответ на понижение температуры является важным сигнальным механизмом ответа на данный стресс. Ca^{2+}-сигнализация задействована в передаче информации о двух параметрах: о величине снижения температуры и о скорости ее снижения. Важна роль Ca^{2+}-сигнализации и в установлении устойчивости к периодическим воздействиям пониженных температур.

2.4. Транскрипционные факторы CBF активируются при холодовом воздействии и запускают экспрессию ряда генов, называемых *COR* генами, необходимых для защиты клетки в условиях низкой температуры.

Воздействие низких температур требует от организма перестройки на клеточном и метаболическом уровнях – включаются механизмы защиты, связанные с поддержанием

стабильности мембран, активности ферментов и синтезом осмопротекторов. Гены, регулирующие эти адаптационные процессы, называют *COR* генами. Они имеют в своих промоторных областях участки связывания транскрипционных факторов, экспрессия которых сильно возрастает в ответ на понижение температуры окружающей среды. Одним из первых охарактеризованных *COR* генов был *COR15*. Обнаружив повышение экспрессии гена *COR15* в ответ на низкие температуры, были исследованы транскрипционные факторы, связывающиеся с его промотором. *Цис*-элемент промотора был назван *DRE* (drought response element), поскольку активировался в ответ на засуху и низкие температуры. Позднее данный элемент был найден в промоторах других генов, чувствительных к холоду. Транскрипционные факторы, связывающиеся с *DRE*, были названы DREB. Различают DREB1 и DREB2 семейства, из которых только DREB1 ответственен за чувствительность к низким температурам. Позднее семейство генов *DREB1* стали называть *CBF* (C-box binding factors). В дальнейшем будем прибегать только к этому названию. У *A. thaliana* семейство генов *CBF* включает трех близкородственных представителей *CBF1, 2* и *3* (также известных как *DREB1B, C* и *A* соответственно). Они быстро активируются в ответ на понижение температуры и вызывают экспрессию своих генов-мишеней. Данные факторы сходны между собой по аминокислотной последовательности, и их функции частично перекрываются (Gilmour et al., 2004). Транскрипционные факторы CBF1, 2 и 3 не только регулируют экспрессию целевых генов устойчивости к холоду, но и сами подвержены регуляции с участием белков ICE1, ICE2 (активируют *CBF* экспрессию) и MYB15 (ингибируют *CBF* экспрессию). При этом экспрессия ICE1 и ICE2 носит конститутивный характер и не зависит от температуры. Несмотря на это, их эффекты, как и следует ожидать, проявляются только при понижении температуры. Возможность такой настройки обеспечивается благодаря посттрансляционным модификациям белков ICE: убиквитинированию и сумоилированию, которые разрушают или стабилизируют белок соответственно. MYB15, также как и ICEs, экспрессируется постоянно, но в отличие от ICEs ингибирует экспрессию генов транскрипционных факторов *CBF* при нормальной температуре. Интересна работа Yang с соавторами, где они показывают, что рецепторная киназа CRPK1 играет роль отрицательного регулятора холодоустойчивости, вызывая деградацию факторов транскрипции CBF. Авторы предполагают, что активная CRPK1 (не путать с CRLK1 см. далее), фосфорилирует белки 14-3-3, за счет чего они транслоцируются в ядро, где вызывают деградацию белков CBF и тем самым ослабляют сопротивляемость холоду (Liu, et al., 2017; Baumann et al., 2017).

Экспрессия генов *CBF* запускается в течение 15 минут от начала холодового воздействия (Gilmour et al., 1998) и достигает максимума через 4 часа. Прекращение транскрипции в смысловом направлении регулируется за счет повышения экспрессии длинной некодирующей РНК SVALKA в антисмысловом направлении. Скопление РНК-полимеразы II на обеих нитях ДНК создает стерические затруднения и делает невозможным нормальную работу фермента. В результате уменьшается количество полноразмерной мРНК *CBF1* и происходит прекращение экспрессии гена (Kindgren et al., 2018)

Высокий уровень экспрессии ТФ CBF активирует экспрессию их целевых генов, регулирующих ответ на холод. Существуют доказательства, что CBF активируют целевые гены *COR* за счет ацетилирования гистона H3 и удаления нуклеосом из их промоторов (Pavangadkar et al., 2010).

Таким образом, факторы транскрипции CBF играют важнейшую роль в акклиматизации высших растений к холоду. Белки CBF распознают *цис*-элемент *CRT/DRE*, который содержит консервативную последовательность CCGAC и обнаружен в промоторах генов *COR*. Когда растения подвергаются воздействию низких положительных температур, экспрессия генов *CBF* индуцируется в течение 15 минут, за чем следует активация нижестоящих генов-мишеней *COR*. Некоторые из этих генов кодируют ключевые ферменты биосинтеза осмолитов, которые повышают устойчивость к замораживанию: за счет накопления криозащитных белков и растворимых сахаров появляется возможность восстанавливать отвердевшие на холоде мембраны и стабилизировать осмотический потенциал клеток. Сами CBF положительно регулируются белками ICE и отрицательно белком MYB15. Активационное влияние CBF на гены *COR* связано с удалением нуклеосом из промоторной области последних за счет ацетилирования гистона H3.

Поскольку активация CBF-регулона является одним их ключевых событий ответа на холодовой стресс, различия между холодоустойчивыми и холодовосприимчивыми видами во многом определяется количеством генов в составе регулона, которые могут быть активированы с помощью CBF. Так, например, по сравнению с холодоустойчивым *A. thaliana* теплолюбивый томат обладает значительно меньшим количеством генов CBF-регулона (Vogel et al., 2004). Растения, испытывающие стресс от низких температур, способны запускать процесс акклиматизации, при этом повышается экспрессия генов пути *CBF-COR*. После прекращения стрессового воздействия при повышении температуры активируется обратный процесс, называемый деаклиматизацией, который представляет

собой возвращение всех процессов к норме. При этом, для процессса деакклиматизации также характерно повышение экспрессии CBF (Noriega et al., 2024).

2.5. Особенности экспрессии *CBF* у разных видов.

У томата гены *CBF* организованы в виде тандемных повторов и расположены на третьей хромосоме между молекулярными маркерами TG520 и CT141. Ни одна из кодирующих белок последовательностей не прерывается интронами (Zhang et al., 2004). Аминокислотные последовательности белков CBF томатов на 70–84% идентичны друг другу и на 51–59% идентичны последовательностям белков CBF1, 2 и 3 *A. thaliana*. Относительно профилей экспрессии разных генов *CBF* в период холодового воздействия получены противоречивые данные. Например, Zhang с соавт. показывают, что у томата при холодовом стрессе увеличивается экспрессия *CBF1*, тогда как экспрессия *CBF2* и *CBF3* остаётся неизменной (Zhang et al., 2004). Другие исследования показывают экспрессию всех трёх типов *CBF* генов при воздействии холода у томатов (Zhang et al., 2020). Данные о величинах экспрессии разных генов *CBF* в ответ на холодовое воздействие разнятся для разных видов, а иногда и для разных популяций внутри одного вида. Так, например, при сравнении двух экотипов *A. thaliana* с разной степенью устойчивости к холоду, было показано наличие нефункционального аллеля *CBF2* у неустойчивого экотипа, но, по-видимому, вклад данного явления в наблюдаемую разницу невелик. Наиболее вероятная причина — меньшая эффективность работы *CBF1* и *CBF3* у холодочувствительного экотипа (Park et al., 2018). В этой же работе было продемонстрировано, что у холодочувствительного экотипа экспрессия *CBF*-независимых ТФ ответа на холод также снижена. Из этого можно предположить, что существует системная разница в восприятии холодового воздействия устойчивым и неустойчивым экотипом. Помимо разницы в уровнях экспрессии между генами *CBF***,** возможно наличие функциональных различий, но данные здесь также противоречивы. Некоторые исследования на *A. thaliana* показывают, что *CBF1, CBF2* и *CBF3* выполняют одну и ту же функцию и активируют один и тот же набор генов (Gilmour et al., 2004). Однако есть и другие исследования, проведённые на *A. thaliana*, которые показывают, что *CBF2* не только выполняет отличную от *CBF1* и *CBF3* функцию (Novillo et al., 2007), но и является потенциальным негативным регулятором *CBF1* и *CBF3* (Novillo et al., 2004). Авторами было показано, что активация экспрессии ТФ *CBF1* и *CBF3* предшествует таковой для *CBF2*. Предполагается, что *CBF2* может являться негативным регулятором данных факторов, обеспечивая нужный для ответа на холодовой стресс уровень мРНК *CBF1* и *CBF3*. Так показано, что способность *cbf2*-мутантов к холодовой акклиматизации не

только не была снижена, а напротив, такие растения продемонстрировали повышенную устойчивость к низкотемпературному стрессу (Novillo et al., 2004).

Для понимания функции генов важно понимать их эволюционную историю. В статье Mboup с соавт. исследовали признаки адаптации к холоду у двух видов диких томатов *Solanum peruvianum* и *S. chilense*. Это два диких вида томата, которые произрастают в тех же условиях, что и использованный в нашей работе вид *S. lycopersicoides*. В данной работе по изучению эволюционных изменений *CBF* генов на диких видах томатов было показано, что имела место дупликация, и, как это часто бывает, после неё эволюция образовавшихся генов пошла независимо. Авторы показали, что *CBF3*, первый ген тандемного массива, по-видимому, находится под очищающим отбором и функционально более важен, *CBF2* находится под действием дизруптивного отбора, демонстрируя межвидовой полиморфизм, а *CBF1* является псевдогеном (Mboup et al.,2012).

В целом, ряд исследований показывает неодинаковые закономерности экспрессии разных *CBF* генов для разных видов томатов в условиях холода. Также профили экспрессии различаются между устойчивыми и неустойчивыми популяциями в пределах одного вида. Однако, несмотря на разнообразную палитру данных, для горных видов томатов показана чёткая закономерность: у холодостойких сортов ген *CBF3* имеет большую базовую и стресс-индуцированную экспрессию по сравнению с холодочувствительными сортами.

Несмотря на наличие спорных вопросов, ряд фактов о работе *CBF* выяснен и представляется достоверным. Несмотря на то, что мишени *CBF1* и *CBF3* перекрываются, для формирования нормального ответа на стресс необходимо синергичное воздействие *CBF1* и *CBF3*. При дефекте одного из данных факторов сопротивляемость холоду у растения уменьшается. Для запуска экспрессии ряда генов-мишеней необходимо наличие как *CBF1*, так и *CBF3* (Novillo et al., 2007). Существуют и другие факторы транскрипции, которые наряду с CBF активируются при воздействии холода. При этом часть из них способна активировать и гены *CBF*-регулона. Для *A. thaliana* к таким факторам относятся HSFC1, ZAT12, ZAT10, ZF и CZF (Park et al., 2015).

Состав генов, входящих в *CBF*-регулон, различается у теплолюбивых и холодостойких растений и играет важную роль в ответе на холодовой стресс. Была выявлена высокая степень взаимосвязи между общим количеством генов *CBF*-регулона и среднемесячной минимальной температурой в регионе, в котором произрастает растение. Это выглядит логично и позволяет предположить, что растениям, которые испытывают воздействие низких температур, могут требоваться особые функции генов, которые не

требуются растениям, обитающим в среде с более умеренными низкими температурами. Для *A. thaliana*, который считается холодоустойчивым растением, показано наличие 35 генов, регулируемых CBF (Fowler et al., 2002; Seki et al., 2001). В противоположность этому, у теплолюбивого томата Zhang с соавт. выявили только три гена, регулируемые холодом, которые были активированы в 2,5 раза или более при сверхэкспрессии *CBF*: два из них кодируют дегидрины, а третий — ингибитор протеиназы. Эти результаты позволяют предположить, что регулон *CBF* у томата может быть меньше по размеру и менее разнообразным по функциям, чем у *A. thaliana*. Из восьми генов томата, которые являются предполагаемыми ортологами генов *A. thaliana*, входящих в регулон *CBF*, ни один не реагировал повышением экспрессии в ответ на увеличение содержания CBF *(*Zhang et al., 2004). Помимо состава *CBF*-регулона, важное значение в регуляции ответа на холод у восприимчивых и устойчивых растений может играть механизм работы белков *CBF*. Имеются данные о наличии белка *SFR6*, который принимает участие в *CBF*-сигналинге на пути, ниже экспрессии *CBF*. Показана ядерная локализация данного белка, и, вероятно, он участвует в активации белков CBF или привлечении их в ядро. В отсутствие *SFR6* гены *COR* не экспрессируются, тогда как *CBF* экспрессируются нормально (Knight et al., 2009). В этой связи интересен тот факт, что нокаутирование *CBF1* гена томата приводит к гиперсенсетизации холода (Li et al., 2018), однако увеличение экспрессии *CBF1* по сравнению с диким типом, против ожидания, не приводило к улучшению сопротивляемости холодовому стрессу. Однако оверэкспрессия *CBF1* гена томата у *A. thaliana* повышала устойчивость последнего (Zhang et al., 2004). Это может быть связано с тем, что у томата по сравнению с *A. thaliana* меньше *CBF*-регулон, и увеличение экспрессии не приводит к значительным изменениям устойчивости к стрессу. Второй причиной может являться механизм функционирования ТФ CBF1, основанный на взаимодействии с белком *SFR6* при активации транскрипции таргетных генов. Если различия в холодочувствительности между томатом и *A. thaliana* связаны с недостатком *SFR6* у томата, оверэкспрессия *CBF1* не приведёт к желаемому эффекту.

2.6. Повышение внутриклеточной концентрациии Ca^{2+} приводит к индукции экспрессии *COR* генов за счет активации нескольких сигнальных путей.

Для того, чтобы произошла активация CBF, сигнал о повышении концентрации Ca^{2+} должен быть передан от ПМ в глубь клетки. Это происходит при помощи различных сигнальных механизмов. Один из механизмов передачи сигнала - это запуск работы кальмодулин-зависимой рецептороподобной киназы 1 (CRLK1), кодирующей серин/треониновую киназу, ассоциированную с плазматической мембраной (Yang et al.,

2010). В ряде экспериментов было показано, что по сравнению с контрольными растениями мутанты *crlk1* проявляли повышенную чувствительность к низким температурам и не демонстрировали увеличения экспрессии *CBF1, RD29A* и *COR15a* в ответ на холодовой стресс. Очень важно, что CRLK1 подавляет активность киназы MPK3/6, которая фосфорилирует и инактивирует ICE1. ICE1 является центральным регулятором реакции растений на холод, и его уровни строго контролируются. Было показано, что MPK3 и MPK6 фосфорилируют ICE1 и способствуют его деградации, таким образом, отрицательно регулируя реакцию на холодовой стресс, тогда как MPK4 положительно регулирует реакцию на холод, подавляя активность киназ MPK3 и MPK6. CRLK1 активирует MAP-киназный каскад с участием MPK4 и тем самым приводит к стабилизации ICE1 (Zhao et al., 2017).

Другое направление передачи сигнала – активация транскрипционных факторов CAMTA, связывающих кальмодулин. При повышении цитозольной концентрации Ca^{2+}, происходит насыщение им кальмодулина и связывание комплексов Ca^{2+}/кальмодулин с транскрипционными факторами CAMTA. Активированные CAMTA направляются в ядро и взаимодействуют с консенсусной последовательностью, расположенной в промоторе гена *CBF2*, запуская его экспрессию. Экспрессия гена *CBF2* нарушается у мутантов *camta3* и в еще большей степени нарушается у *camta1* и *camta3*-мутантов. Таким образом, ТФ CAMTA контролируют содержание ТФ CBF, которые запускают экспрессию генов *COR*. Более того, CAMTA1, CAMTA2 и CAMTA3 работают совместно, индуцируя экспрессию *CBF1, CBF2* и *CBF3* и повышая устойчивость растений к низким температурам (Iqbal et al., 2020). Интересен тот факт, что транскрипционные факторы CAMTA чувствительны к скорости снижения температуры. Так, CAMTA3 и CAMTA5 запускают активацию *CBF* в ответ на быстрое снижение температуры, однако они не чувствительны к постепенному похолоданию. Это один из примеров того, как растения эффективно контролируют приобретение устойчивости к заморозкам, используя два различных сигнальных пути в ответ на постепенное понижение температуры во время сезонных изменений и внезапное понижение температуры ночью (Kidokoro et al., 2017). ТФ CAMTA запускают экспрессию не только *CBF* генов, но и генов семейства *ZAT*. Сообщается, что белок ZAT12 участвует в регуляции экспрессии некоторых генов холодового ответа (Ma et al., 2017). В промоторах генов *CBF2* и *ZAT12* было обнаружено семь консервативных мотивов (КМ) длиной от 6 до 9 п.н., которые обеспечивали активацию транскрипции под действием холода. Данные последовательности сгруппированы внутри промоторных областей *CBF2* и *ZAT12*, но в каждом промоторе расположены в разном порядке. В серии экспериментов авторы показали, что ТФ

CAMTA3 является основным белком CAMTA, способствующим положительной регуляции транскрипции через связывание КМ2 в промоторе *CBF2* при холодовом воздействии (Doherty et al., 2009).

Таким образом, имеется разветвленная сигнальная сеть, запускаемая повышением цитозольной концентрации Ca^{2+}, и приводящая в конечном итоге к повышению содержания ТФ CBF, необходимых для активации генов *COR*. В активации экспрессии *CBF* задействованы разные механизмы: MAPK-каскады, Ca^{2+}/кальмодулиновый сигналинг через CRLK1, Ca^{2+}/кальмодулиновый сигналинг через CAMTA и др. (рис. 1).

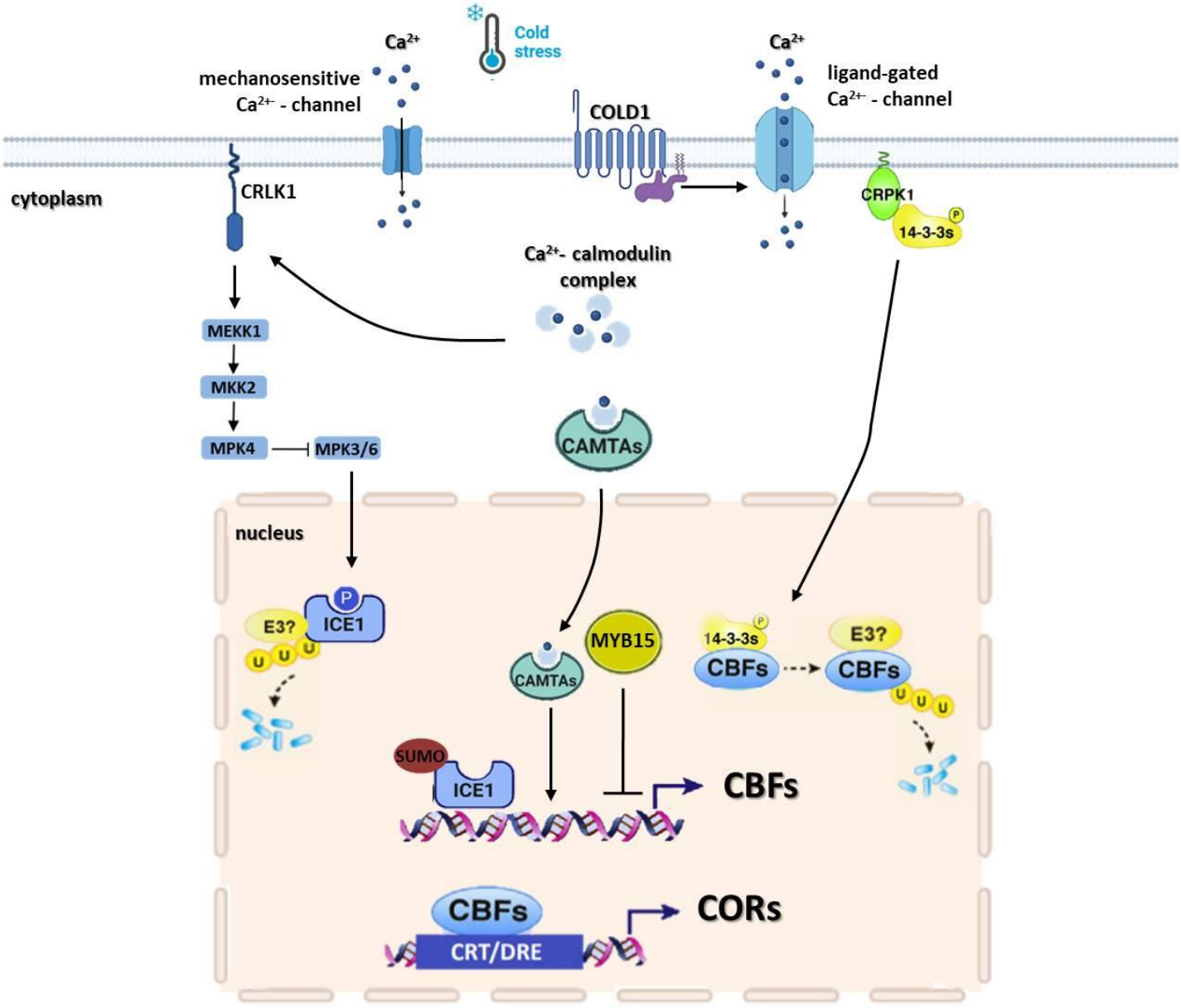

Рис. 1 — Схема трансдукции холодового сигнала в растительной клетке. Пусковым механизмом служит увеличение концентрации Ca^{2+} в клетке. Это может происходить за счет активации механочувствительных каналов плазмалеммы или через изменение конформации белка COLD1, который связан с α-субъединицей G-белка, которая может активировать Ca^{2+}-каналы. Ион Ca^{2+} в цитоплазме связывается с кальмодулином. Данный комплекс активирует киназу CRLK, которая опосредованно ингибирует MAPK3/6, и тем самым снимается блок работы белка ICE. Белок ICE является положительным регулятором экспрессии *CBF*. Также Ca^{2+}/кальмодулиновый комплекс активирует ТФ CAMTA, которые напрямую активируют экспрессию *CBF*. ТФ CBF активируют экспрессию генов холодоустойчивости – *COR* генов (с изменениями по Shi et al., 2018).

Несмотря на большой прогресс, сделанный в изучении транскрипционных факторов, способствующих экспрессии генов устойчивости к холоду (*COR*-генов), о функции самих генов *COR* известно значительно меньше. Лишь для отдельных представителей имеются данные о структуре и функциях. К достаточно хорошо охарактеризованным генам относятся, например *COR15a* и *COR15b*. Показано, что конститутивная экспрессия *COR15a* в трансгенных растениях *A. thaliana*, повышает устойчивость к отрицательным температурам как хлоропластов, так и протопластов. Эти результаты представляли собой первое прямое доказательство того, что ген *COR* играет роль в холодоустойчивости (Artus et al., 1996). Позднее было выяснено, что COR15 является внутренне разупорядоченным белком при нормальном водном балансе клетки. Однако, когда наблюдается уменьшение внутриклеточного содержания воды (когда при заморозках происходит образование льда в апопласте, и вода уходит из клетки) белок приобретает вторичную структуру и формирует амфипатическую α-спираль. В таком состоянии COR15 связывается с моногалактозилдиацилглицерином (МГДГ) в составе мембраны хлоропласта и цитоплазматической мембраны, стабилизируя и защищая их от повреждений. Интересно, что мутация одновременно в *COR15a* и *COR15b* приводит к повреждению цитоплазматической мембраны при низкотемпературном стрессе, но для хлоропластных мембран наблюдаются компенсаторные механизмы защиты в отсутствие данных белков (Thalhammer et al., 2014). Другим геном, структуры и функции которого были недавно исследованы, является ген *COR413*. Данный ген кодирует несколько белков, локализованных в плазматической или тилакоидной мембранах. Предположительно, данные белки имеют пять трансмембранных доменов и предупреждают повреждение мембран при пониженных температурах. Было показано, что сверхэкспрессия *COR413* в томатах снижала степень повреждения клеточной мембраны. Кроме того, у трансгенных

растений наблюдалась более высокая активность ферментов супероксиддисмутазы, пероксидазы и каталазы, а также содержание пролина и сахаров (Zhang et al., 2021).

Помимо генов *COR*, транскрипционные факторы CBF, регулируют экспрессию генов оксидаз гиббереллинов (ГБ). Показано, что растения *A. thaliana*, конститутивно экспрессирующие *CBF1, CBF2* или *CBF3*, растут медленно, имеют карликовый фенотип и отложенные сроки цветения. Причина этого - накопление белков DELLA, которые являются частью сигнального пути ГБ. В растениях с нормальным уровнем биологически активных ГБ белки DELLA расщепляются по убиквитин-протеасомному пути. Однако, когда уровень ГБ низкий, белки DELLA накапливаются, и, действуя как факторы транскрипции, сдерживают рост и вызывают задержку цветения, что является физиологически выгодным при воздействии холодового стресса. CBF контролируют экспрессию генов оксидаз, разрушающих ГБ, что приводит к накоплению DELLA-белков (Thomashow et al., 2010).

Можно заключить, что *COR* гены представляют собой особую группу генов, экспрессия которых активируется в ответ на пониженную температуру. Данные гены содержат в своей промоторной области последовательность связывания с транскрипционными факторами CBF. Среди *COR* генов имеются гены белков, стабилизирующих мембраны, регулирующих активность антиоксидантных ферментов, активирующих синтез криопротекторов (Milovskaya, 2024).

3. Первичный сенсор холода у цианобактерий и параллель с первичным сенсором у высших растений.

Как следует из вышеизложенного, в вопросе первичной рецепции холода высшими растениями очень много неясного. Для формулирования гипотез полезно понимать механизмы холодовой рецепции другими организмами, в частности цианобактериями. Для данных фотосинтезирующих микроорганизмов холодовое воздействие является серьезным стрессом. Рецепция холода у цианобактерий представляет собой многоуровневый процесс, включающий физические изменения мембран, редокс-сигнализацию, транскрипционную регуляцию (Sinetova et al., 2017; Hsiao et al., 2015). Одной из первых реакций в ответ на понижение температуры является уменьшение текучести мембран, что изменяет поведение встроенных сенсорных белков. Для цианобактерии *Synechocystis sp.* PCC 6803 установлено, что снижение температуры вызывает уплотнение мембран, являющееся первичным сигналом для холодового ответа (Murata, Wada, 1995; Los et al., 1997). У цианобактерий имеется гистидин-киназа Hik33 (также известная как NblS), обладающая несколькими трансмембранными доменами,

которые чувствительны к физическим изменениям мембраны. При снижении температуры окружающей среды происходит конформационное изменение Hik33, активирующее её автокиназную активность (Suzuki et al., 2000; Mikami et al., 2002). Показано, что при индукции холодового стресса у *Synechocystis* мутанты, лишённые Hik33, теряют способность индуцировать более половины холодово-регулируемых генов (Suzuki et al., 2000; Sinetova et al., 2017). Следовательно, Hik33 рассматривается как основной сенсорный компонент, воспринимающий изменение физических свойств мембран при понижении температуры. Таким образом, сенсорный механизм передачи сигнала у цианобактерий может быть описана следующим образом: 1. Понижение температуры 2. Снижение текучести мембран 3. Активация Hik33. 4. Запуск компенсаторных процессов на разных уровнях регуляции. Эта стратегия позволяет поддерживать текучесть мембран при низких температурах и стабилизировать фотосинтетический аппарат. Нарушение холодового ответа (например, у мутантов по Hik33) приводит к фотодестабилизации ФС II и накоплению активных форм кислорода (АФК) (Kanesaki et al., 2002). Интересно, что Hik33 функционирует как общий сенсор стресса: она участвует в ответе не только на холодовой, но и на гиперосмотический стресс, высокую солёность и интенсивный свет, что указывает на интеграцию нескольких сигналов в единую регуляторную сеть (Los et al., 2010; Hsiao et al., 2015). Несмотря на значительный прогресс, остаются открытыми ключевые вопросы. Не до конца ясно, как физическое изменение текучести мембраны трансформируется в структурную перестройку Hik33. Недостаточно изучены и специфические механизмы, позволяющие Hik33 различать холодовой, световой и осмотический сигналы (Sinetova et al., 2017). Изучение этих процессов имеет практическое значение, поскольку понимание механизмов рецепции холодового стресса у цианобактерий может быть использовано для разработки генетических стратегий повышения холодоустойчивости культурных растений (Los et al., 2010). Сам факт использования состояния мембраны цианобактериями в качестве рецептора температуры, наводит на мысль, что текучесть плазматической мембраны может выполнять эту же функцию и у высших растений. Гипотеза о возможной роли текучести плазматической мембраны в качестве первичного сенсора холодового стресса у высших растений является объектом проверки в данной работе (Milovskaya, 2024).

4. Нарушение баланса накопления и расходования энергии при холодовом стрессе вызывает фотоингибирование фотосистемы II и включает механизмы защиты реакционнного центра фотосистемы II.

В стрессовых условиях балансировка потоков накопления и расходования энергии является важной и сложной задачей. Временные шкалы отдельных этапов энергетических преобразований сильно разнятся, что ведёт к необходимости применять разные механизмы регуляции к каждому конкретному этапу. Так, поглощение энергии света и разделение зарядов происходит в интервалах 10^{-15}-10^{-12} сек, процессы транспорта электрона занимают 10^{-3}-10^{-1} сек, восстановление CO_2 и образование запасных питательных веществ – десятки секунд, а расходование запасенной энергии на деление клеток и рост происходит в течение минут и часов. Таким образом, не только процессы запасания и расходования энергии происходят на разных временных интервалах, но и сам процесс преобразования энергии солнечного света в химическую дробится на несколько разноскоростных этапов.

Воздействие низких температур на процессы разных этапов неодинаково: ингибирование переноса электронов (за счет увеличения вязкости мембраны) и снижение скорости ферментативных реакций, участвующих в восстановлении C, N и S, происходит в гораздо большей степени, чем угнетение фотохимических процессов в РЦ. В результате этого возникает так называемое «давление возбуждения» ФС II, когда степень поглощения энергии реакционным центром превосходит способность клетки к дальнейшему преобразованию этой энергии (Huner et al., 1998). Датчиком «давления возбуждения» является степень восстановленности пула пластохинонов (ПлХ), забирающих электрон у ФС II. В качестве первичного датчика, пул перевостанновленных ПлХ может генерировать биохимические сигналы, которые регулируют транскрипцию генов, участвующих в адаптации к холоду, как в хлоропласте, так и в ядре. Для поддержания энергетического баланса регуляция может представлять собой либо корректировку накопления энергии и, следовательно, первичных реакций фотосинтеза и состояния окислительно-восстановительных компонентов фотосинтетической цепи переноса электронов, либо регулировку способности расходовать эту энергию, и, следовательно, активность ферментов, участвующих в фиксации углерода. Механизмы данного явления очень схожи с механизмами защиты от избыточного освещения. Воздействие либо высокой освещенности, либо низкой температуры может вызвать сопоставимо высокое давление возбуждения ФС II, которое может привести к фотоингибированию, зависящему от света снижению скорости фотосинтеза. К механизмам борьбы с фотоингибированием относятся рассеивание энергии в виде тепла

(нефотохимическое тушение), активация ксантофиллового цикла, разрушение белка D1 ФС II. Таким образом, фотоакклиматизация к низкой температуре имитирует фотоакклиматизацию к яркому свету и задействует механизмы перераспределения избыточной энергии. Еще одним механизмом защиты от фотоповреждения является активация циклических потоков электронов вокруг ФС I и ФС II. Важную роль в активации механизмов нефотохимического тушения и механизмов, приводящих к запуску циклических потоков электронов вокруг ФС I, играет соотношение красного и дальнего красного света в спектре. В природе растения часто испытывают воздействие низкой температуры и высокое соотношение красного к дальнему красному (КС/ДКС) света из-за увеличивающейся продолжительности сумерек в прохладное время года. Wang с соавт. предположили, что увеличение соотношения КС/ДКС приводит к активации PGR5 (proton gradient regulation 5)-опорседованного циклического транспорта вокруг ФС I, а также активации механизмов нефотохимического тушения. В статье описывалось, что PGR5-зависимый циклический транспорт активируется под действием низкой температуры и способствует фотопротекции при холодовом стрессе у томата. (Wang et al., 2020).

Таким образом, вследствие воздействия низких температур скорость фотохимических процессов, на которые холод влияет в меньшей степени, чем на биохимические процессы, должна быть скорректирована с учетом снижения метаболической активности растения. Механизмы защиты фотосинтетического аппарата от холода такие же, как и от избыточного освещения. Это связано с одинаковой природой возникающей проблемы – избыточным давлением возбуждения ФС II, когда пул хинонов перевосстановлен и отток энергии от РЦ ФС II затруднен (Milovskaya, 2024).

5. Стратегии повышения холодоустойчивости теплолюбивых растений.

Для достижения устойчивости теплолюбивых растений к холоду используются различные генетические подходы, основанные на знаниях об адаптации растений к пониженным температурам. Томаты являются одним из наиболее часто культивируемых видов овощей во всем мире. Помимо своей пищевой ценности они являются хорошим модельным растением, чувствительным к холоду. Биотехнологические методы, используемые для модификации томатов, основаны на внедрении генов, кодирующих ферменты, которые, помогают клеткам нивелировать воздействия стресса, или генов, участвующих в передаче сигналов в различных регуляторных путях. Далее кратко рассмотрены стратегии, применяемые в настоящее время для поиска способов создания холодоустойчивых томатов.

Транскрипционные факторы (ТФ). Как было сказано выше, у высших растений воздействие низких температур активирует ТФ CBF, которые в свою очередь запускают экспрессию регулируемых ими *COR*-генов. Важную роль в активации CBF играют Ca^{2+}-сигнализация и MAP-киназный каскад (Knight et al., 2012). Оверэкспрессия *CBF* может в некоторых случаях являться перспективным подходом для увеличения содержания белковых продуктов генов, помогающих растению противостоять пониженным температурам. Так, оверэкспрессия *ZmCBF3* в трансгенном рисе повышала устойчивость к засухе, соли и низким температурам (Xu et al., 2011). Известны попытки модификации холодоустойчивости томатов путем введения генов, кодирующих CBF (Shah et al., 2017).

Осмо- и криопротекоры. Важную роль при адаптации к низким положительным температурам играет синтез крио- и осмопротекторов. Одним из осмопротекторов является глицинбетаин (ГЛБ). ГЛБ представляет собой триметилглицин и механизм его протекторного действия может заключаться в следующем: 1) ГЛБ, представляя собой амфифильное незаряженное вещество и накапливаясь в цитоплазме, является осмопротектором и способствует поддержанию нужного осмотического давления цитоплазмы; 2) Будучи цвиттерионом, ГЛБ может взаимодействовать как с гидрофильными, так и с гидрофобными доменами белков и мембран, способствуя стабилизации и поддержанию структурной и функциональной целостности этих молекул; 3) ГЛБ может участвовать в активации H_2O_2-связанных сигнальных путей, приводящих к синтезу необходимых для устойчивости к холоду генов (Annunziata et al., 2019). Интересен тот факт, что не все растения способны синтезировать ГЛБ. Внедрение ферментов биосинтеза ГЛБ в растения-неаккумуляторы может явиться перспективным подходом в создании холодоустойчивых растений. У высших растений, способных к накоплению ГЛБ, данное вещество синтезируется с участием двух ферментов, тогда как у бактерий *Arthrobacter globiformis* и *Arthrobacter pascens* для этого требует только один фермент – холиноксидаза – для катализа прямого превращения холина в ГЛБ. Park с соавторами вводили ген холиноксидазы в растения томатов, используя вектора, обеспечивающие локализацию в цитозоле, хлоропластах или одновременно в двух компартментах. Ученые выяснили, что больший уровень накопления ГЛБ наблюдался в цитоплазме, однако, несмотря на меньшее содержания ГЛБ в хлоропластах, именно трансгенные растения с локализацией ГЛБ в пластидах демонстрировали большую холодоустойчивость (Park et al., 2007). Это показывает важность клеточной локализации ГЛБ при стрессах, а также подтверждает его протекторную роль в отношении белков ФС II, о которых сообщалось ранее (Papageorgiou et al., 1995). Также важно отметить, что повышение уровня H_2O_2, являющегося побочным продуктом катализируемого

холиноксидазой синтеза ГЛБ в трансгенных растениях, может активировать защитный механизм, приводящий к улучшению переносимости холодового стресса.

Антифризные белки. Об антифризной активности белков у растений впервые было сообщено в работе Urrutia с соавт. (1992), и с тех пор антифризные белки (АФБ) были найдены у многих зимующих видов сосудистых растений, в том числе у папоротников, голосеменных, однодольных и двудольных покрытосеменных. АФБ растений предотвращают рост кристаллов льда, физически взаимодействуя с ними. Таким образом, механизм накопления АФБ представляет собой защиту от отрицательных температур. Анализ структурных особенностей некоторых из данных белков показал, что в их структуре преобладает β-складчатая конформация. Предполагается, что плоскость, которую формируют β-листы обеспечивает контакт белка с поверхностью кристалла (Gupta et al., 2014). Kuiper с соавторами впервые предложили трехмерную модель АФБ райграса *Lolium perenne*, состоящую из β-складок, разделённых петлями из 14-15 аминокислотных остатков, и образующих два паралелльных β-листа, укрепленных гидрофобной серединой из валина и внутренними аспарагиновыми остатками на концах. Таким образом, согласно данной модели имеются два обращенных друг к другу участка связывания льда, которые позволяют ингибировать процесс кристаллизации и соответственно нивелировать повреждающее действие кристаллов на клетку (Kuiper et al., 2001). Роль АФБ растений, таким образом, состоит в том, чтобы непосредственно взаимодействовать со льдом и уменьшить повреждения, замедляя рост и рекристаллизацию льда. Кроме того, АФБ играют криопротекторную роль в отношении некоторых мембран, предотвращая фазовый переход липидов и стабилизируя кальциевые каналы. Исследования показали, что у растений экспрессия генов АФБ происходит во время низкотемпературной акклиматизации (Urrutia et al., 1992). Условия, используемые для закаливания, имитируют осень, когда дни становятся короче и холоднее, т.е. низкие температуры и длина светового дня являются важными сигналами для производства АФБ. Kumar с соавторами предприняли попытку трансформации растений томата геном АФБ моркови. По результатам их эксперимента было показано, что трансгенные растения томатов при воздействии температуры +4 °C в течение 48 часов демонстрировали повреждение мембран в меньшей степени по сравнению с растениями дикого типа. Это первое исследование, в котором интеграция гена АФБ в геном была использована в качестве механизма создания холодоустойчивых растений (Kumar et al., 2014).

Мембранные липиды и АФК. Важнейшая роль в регуляции ответа растения на неблагоприятное воздействие отводится клеточным мембранам и активным формам кислорода. При понижении температуры ацильные остатки в мембранах фосфолипидов

упаковываются плотнее и мембраны изменяют свою текучесть. Это результирует в изменении активности мембраносвязанных белков, запускает Ca^{2+}-сигнализацию и продукцию вторичных мессенджеров липидной природы, таких как фосфатидная кислота и фосфосфинголипиды. Ca^{2+}-сигнализация индуцирует активацию ТФ CBF и далее экспрессию генов, вовлеченных в механизмы реакции на холодовой стресс (Knight et al., 2012). Липидные мессенджеры могут активировать целевые гены устойчивости к холодовому стрессу, запуская АФК-сигнализацию. Помимо целенаправленной продукции АФК через внутриклеточные сигнальные механизмы с участием липидных компонентов, при холодовом стрессе АФК производятся и в результате обменных процессов. При низких температурах в результате усиления оксигеназной активности Rubisco в хлоропластах увеличивается продукция гликолата, который фиксируется и восстанавливается до глицерата при фотодыхании. Побочным продуктом фотодыхания является образование H_2O_2, которая может выступать в роли сигнальной молекулы (Ritonga et al., 2020).

Продолжая обсуждение роли мембранных липидов в сенсетизации холодового стресса, следует отметить, что повреждение хлоропластных мембран приводит к нарушению функционирования фотосинтетического аппарата. Последствия этого проявляются незамедлительно, являются наиболее ярко выраженными и приводят к другим нарушениям структуры клетки. Невозможность осуществления электронного транспорта вызывает окисление ФС II и продукцию АФК с последующим перекисным окислением липидов и белков. Можно говорить, что хлоропласты являются органеллами, которые первыми чувствуют холодовой стресс. Фотоингибирование ФС II, происходящее при низких температурах, приводит к обновлению D1-белка. Механизм защиты от фотоингибирования ФС II, происходящего при холодовом стрессе, связан с наличием полиненасыщенных ЖК в мембране. Подтверждением главенствующей роли именно хлоропластных мембран в развитии ответа на воздействие низких температур являются эксперименты с оверэкспрессией десатуразных генов с разной локализации белковых продуктов (Dominguez et al., 2010). Несмотря на многокомпонентный характер изменений, происходящий в клетке при воздействии низких температур, липидный состав мембран можно рассматривать как одну из наиболее перспективных точек приложения исследований для разработки холодоустойчивых сортов растений. Наиболее часто применяемым способом внесения изменений в ЖК-состав мембран является экспрессия десатураз.

Гетерологичные десатуразы ЖК как способ модификации липидного состава и регуляции чувствительности к холодовому стрессу. Десатуразы ЖК представляют собой ферменты, катализирующие превращение одинарной связи между атомами углерода в

ацильных цепях (C-C) в двойные связи (C=C). Данные ферменты являются оксидазами со смешанной функцией, и для катализа им необходимы два электрона, донорами которых могут служить НАДФН или НАДН в зависимости от локализации десатуразы (Лось с соавт., 2001). Все известные десатуразы в зависимости от формы, в которой находится ЖК, подвергающаяся окислению, делятся на три типа: ацилCoA- (используют ЖК, связанную с ацетил-CoA), ацил-АПБ- (используют ЖК, связанную с ацилпереносящим белком) и ацил-липидные десатуразы (используют ЖК в составе фосфолипидов). При этом первые два типа являются растворимыми ферментами, а ацил-липидные десатуразы – мембраносвязанными. У растений присутствуют ацил-АПБ (располагаются только в пластидах, растворимые) и ацил-липидные (тип I – в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), тип II – в пластидах, мембраносвязанные) десатуразы (Лось с соавт., 2001). Предполагается, что десатуразы связывают два атома Fe^{3+}, которые формируют активный комплекс с атомом кислорода. Структура фермента определена только для рекомбинантной растворимой Δ9-стеароил-АПБ десатуразы мыши. Было показано, что фермент имеет в своем составе две идентичные субъединицы, каждая из которых формирует активный центр, содержащий два атома трехвалентного железа (Lindqvist Y. et al., 1996). В отличие от растворимых ацил-АПБ десатураз, ацил-липидные десатуразы расположены в мембране и имеют консервативные гидрофобные области. Второй важной особенностью мембранных десатураз, отличающих их от растворимых форм, является наличие трех консервативных гистидиновых кластеров, участвующих в формировании активного центра.

Важность десатураз в регуляции чувствительности к низким температурам, а также возможность их использования в качестве инструмента для потенциации холодоустойчивости была продемонстрирована в ряде работ. Одним из примеров является работа Dominguez с коллегами, где авторы показали, что трансгенные растения, экспрессирующие *FAD7*, в способности противостоять низким температурам превосходят растения, экспрессирующие *FAD3*. Причина этого состоит в локализации ферментов. FAD7 является десатуразой хлоропластов, тогда как FAD3 – фермент, локализованный в эндоплазматическом ретикулуме. Предполагается, что ненасыщенные ЖК в составе хлоропластной мембраны играют важную роль в защите белков ФС II от воздействия низких температур. Поскольку FAD7 локализуется в хлоропластной мембране, его роль в защите от холодового стресса наиболее выражена. Стоит отметить, что при закаливании трансгенные *FAD3*-томаты демонстрировали устойчивость к холоду, сопоставимую с таковой для *FAD7*-растений, что может быть объяснено перемещением 18:3 ЖК от ЭР к хлоропластам в процессе закаливания (Dominguez et al., 2010). Таким образом,

локализация фермента может играть важную роль в регуляции холодоустойчивости, и это необходимо учитывать, используя десатуразы в качестве инструментов создания толерантности к пониженным температурам (Milovskaya, 2024).

6. Синтез ЖК в растительных клетках.

У высших растений процессы десатурации жирных кислот проходят в двух клеточных компартментах: пластидах и ЭР. Путь, протекающий в пластидах называют «прокариотическим», путь, протекающий в ЭР – «эукариотическим». Синтез жирных кислот начинается в пластидах, где активность фермента синтазы жирных кислот приводит к образованию пальмитиновой (16:0) и стеариновой (18:0) кислот. Далее образовавшиеся кислоты могут стать субстратом для десатураз, вводящих двойные связи и продуцирующие ненасыщенные ЖК. «Прокариотический» путь образования ненасыщенных ЖК осуществляется полностью в пластидах. Образованные 16:0 и 18:0 кислоты конъюгируют с глицерин-3-фосфатом, в результате чего образуется фосфатидная кислота (ФК). ФК является субстратом для действия ω-6 FAD6 и ω-3 FAD7 или FAD8 десатураз, которые синтезируют 9,12-18:2 и 9,12,15-18:3 ЖК соответственно (He et al., 2020). «Эукариотический» путь образования ненасыщенных ЖК протекает со сменой компартментов, в которых находятся ЖК на различных этапах процессинга. Поскольку синтаза жирных кислот работает только в пластидах, а десатурация «эукариотического» типа происходит в ЭР, стартовые вещества десатурации должны быть транспортированы из одного компартмента в другой. С16-кислота транспортируется в насыщенной форме, С18-кислота должна быть подвергнута десатурации по Δ9-положению (с помощью фермента SSI2, являющегося растворимой ацилАПБ-десатуразой и не задействованного в прокариотическом пути) и только потом может быть транспортирована из пластид. Предполагается, что ЖК могут самостоятельно диффундировать в межмембранное пространство, или могут быть транслоцированы при участии переносчиков семейства FAX. Переносчиками из межмембранного пространства в цитоплазму предположительно могут являться длиноцепочечные ацилСоА-синтазы (LACS), локализованные во внешней мембране пластид. Активированная ЖК перенесенная в цитоплазму с помощью LACS, транспортируется в ЭР посредством ацил-СоА связывающего белка. На мембране ЭР остаток ЖК из ацилСоА участвует в синтезе фосфатидилхолина (ФХ) – основного траспортера ЖК в ЭР. Помимо вышеописанного способа, 9-18:1 и 16:0 ЖК могут быть транспортированы из пластид в ЭР напрямую, минуя цитоплазму, в местах контакта мембран двух органелл. Перенос при этом осуществляется через ФХ. Перенесённые в ЭР ЖК подвергаются десатурации с помощью ω-6 FAD2 и ω-3 FAD3. Образованные

полиненасыщенные ЖК могут транспортироваться посредством ФХ или ФК обратно в пластиды или к цитоплазматической мембране. При этом на мембране пластид в связывании и переносе ФК участвуют три белка: TGD1-3 (транспортёр внешней мембраны хлоропласта), TGD4 (транспортёр внутренней мембраны) и TGD5 (белок, расположенный в межмембранном пространстве и связывающий TGD1-3 и TGD5) (Li N. et al., 2016). Транспорт ЖК из ЭР к плазматической мембране может осуществляться через прямой контакт мембран, посредством везикул либо за счет белковых переносчиков. Так, АПБ1 и 2 имеют домены связывания с ЭР и плазмалеммой и выполняют функцию переносчиков. При этом, АПБ1 связывает С18-ацил-СоА, АПБ2 специфичен в отношении С16-ацил-СоА. Таким образом, имеется согласованный обмен ЖК между тремя разными органеллами: пластидами, где начинается синтез, ЭР и ПМ (Milovskaya, 2024).

7. Роль фоторецепторов растений в восприятии температуры.

В последние годы представления о механизмах формирования морозоустойчивости у растений существенно расширились и вышли за рамки классической модели, в которой ключевую роль отводили исключительно температуре как инициирующему фактору холодовой акклимации. Накопленные данные свидетельствуют о том, что растения интегрируют информацию о температуре с сигналами других факторов среды, прежде всего света, что позволяет им более точно прогнозировать наступление неблагоприятных условий и заблаговременно запускать защитные программы. Однако несмотря на показанную роль, которую играют фоторецепторы в регуляции адаптации растения к температуре окружающей среды, важно отметить, что чаще всего демонстрируется роль фоторецепторов в ответе на нестрессовый диапазон изменения температур. Иными словами, фоторецепторы оказывают регуляторную роль в рамках физиологически оптимальных температурных условий (суточные колебания, небольшие изменения температуры). Если же речь идет о восприятии абсолютной температуры, активное участие принимают другие механизмы (например, изменение текучести мембраны).

Так в статье Franklin et al., авторы проверяли, может ли световой сигнал, а именно низкое соотношение красный/дальний красный (что соответствует условиям затенения), сам по себе усиливать *CBF*-ответ и повышать морозоустойчивость без сопутствующего снижения температуры окружающей среды (Franklin and Whitelam., 2007). Удалось выяснить, что снижение соотношения красный/дальний красный способно индуцировать экспрессию транскрипционных факторов семейства *CBF*, которые традиционно рассматриваются как центральные регуляторы холодового ответа. Таким образом, световой сигнал может активировать ключевые элементы «холодового ответа» даже при

температурах, превышающих те, которые обычно необходимы для классической холодовой акклиматизации. Принципиально важно, что данная световая регуляция экспрессии *CBF* носит циркадно-зависимый характер, то есть реализуется в определённые временные окна суточного цикла. Это указывает на тесную связь между рецепцией качества света, циркадными часами и температурными ответами и подчёркивает роль циркадных ритмов растения в формировании адаптивных реакций. Такая организация сигнальных путей позволяет растению синхронизировать повышение готовности ответа на холодовое воздействие с предсказуемыми суточными изменениями температуры, прежде всего ночным похолоданием. Несмотря на выявленную закономерность, авторы также показали, что связь *CBF* с индукцией их мишеней (*COR*-генов) зависит от температуры окружающей среды. Это интерпретируется как наличие дополнительного температурно-регулируемого уровня, который определяет, будет ли повышение уровня CBF реально запускать активацию *COR* генов. Другими словами, световой сигналинг, воспринимаемый фоторецепторами, может подготовить растение к ускоренному ответу на снижение температуры, но для полноценного запуска защитной реакции на холодовой стресс необходимо реальное понижение температуры. Из этого следует, что фитохромы рецепторами низкой температуры не являются, и сеносорную функцию выполняют другие структуры.

В работе Lee и Thomashow было показано, что фотопериод является важным фактором регуляции холодовой акклиматизации у растений, а длина дня способна существенно влиять на функционирование регуляторной системы *CBF–COR* и уровень морозоустойчивости у *A. thaliana* при нестрессовых температурах (Lee, Thomashow, 2012). В условиях «короткого» дня базовый уровень транскриптов *CBF* значительно выше, чем при «длинном» дне, что сопровождается повышением устойчивости растений к холодовому стрессу. Напротив, при длинном дне наблюдается активное подавление *CBF*-зависимых механизмов защиты от холода, что интерпретируется как механизм предотвращения энергетически затратной подготовки к холоду в летний период. Молекулярной основой данной фотопериодической регуляции является светосигнальный модуль, включающий фитохром B и транскрипционные факторы PIF4 и PIF7, которые на «длинном» дне репрессируют экспрессию *CBF* через взаимодействие с промоторными элементами. При укорочении дня эта репрессия ослабевает, что приводит к повышению активности *CBF*-зависимой сигнализации и формированию предварительной готовности ответа на холодовой стресс. Таким образом, CBF-регулон выступает в роли узлового элемента интеграции фотопериодических, световых и температурных сигналов, а фитохромы и PIF-факторы — как ключевые посредники, связывающие рецепцию света с

механизмами термо- и холодорецепции у растений. Отметим, что также как и по результатам работы Franklin et al., здесь показана фитохром-опосредованная подготовка к возможному снижению температуры, но не прямая рецепция температурных изменений.

Если для фитохромов температурная функция связана преимущественно с кинетикой темновой конверсии активной формы (Jung et al., 2016), то для рецепторов синего света семейства LOV-домен-содержащих белков потенциальная терморецепторная роль реализуется через температурную зависимость времени жизни фотоактивированного состояния. К числу таких белков относятся фототропины, которые первоначально рассматривались исключительно как рецепторы синего света, однако в настоящее время привлекают внимание как возможные участники терморецепции у растений (Fujii et al., 2017). Но также как и для фитохромов, их участие в терморецепции демонстрируется косвенно в рамках нестрессового диапазона температур для праймирования последующих термозащитных реакций.

Фототропины представляют собой серин/треонин-протеинкиназы, активируемые синим светом, и у покрытосеменных растений обычно представлены двумя изоформами — PHOT1 и PHOT2 (Christie et al., 2015). Эти белки содержат два фотосенсорных LOV-домена (LOV1 и LOV2) в N-концевой части и С-концевой киназный домен, активность которого регулируется состоянием LOV2 и прилегающих регуляторных участков (Hart et al., 2021). Функционально фототропины участвуют в регуляции фототропизма, движения хлоропластов, открывания устьиц и морфогенеза листовой пластинки, обеспечивая оптимизацию использования световой энергии (Inoue et al., 2008; Christie et al., 2015). Ключевой особенностью фототропинов является фотохимическое образование ковалентного аддукта между флавиновым кофактором и остатком цистеина в LOV-домене, что приводит к конформационным изменениям белка и активации киназной активности (Zayner et al., 2012). Фотоактивированное состояние LOV-домена фототропинов является термодинамически нестабильным и подвергается спонтанной термической релаксации, скорость которой существенно зависит от температуры (Zayner et al., 2012; Fujii et al., 2017). При понижении температуры время жизни фотоактивированного состояния увеличивается, тогда как при повышении температуры оно сокращается. На основании этих данных была сформулирована концепция, согласно которой фототропин способен воспринимать температуру через изменение длительности собственной активной фазы, а не через отдельный специализированный температурочувствительный домен (Fujii et al., 2017). В данном случае сигнал о температуре кодируется временем жизни активного состояния.

Перемещение хлоропластов является одной из наиболее хорошо изученных фототропин-зависимых реакций. В слабом свете хлоропласты перемещаются в положение, обеспечивающее максимальное поглощение фотонов, тогда как при сильном освещении запускается защитная реакция избегания света (Kasahara et al., 2002; Ishishita et al., 2020). У *A. thaliana* фототропин 1 преимущественно участвует в реакциях на слабый свет, тогда как фототропин 2 играет ключевую роль в реакции избегания сильного света (Ishishita et al., 2020). Показано, что при низких температурах характер хлоропластных движений изменяется даже при неизменных световых условиях. У папоротников и печёночников выявлено холодоиндуцированное позиционирование хлоропластов, опосредованное фототропином (Kodama et al., 2008; Fujii et al., 2020). Особенно убедительные данные получены на *Marchantia polymorpha*, где фототропин представлен одним геном и демонстрирует выраженную терморецепторную функцию (Komatsu et al., 2014; Fujii et al., 2017). С физиологической точки зрения такая регуляция является адаптивной, поскольку при низких температурах возрастает риск фотоповреждения вследствие снижения скорости темновых реакций фотосинтеза (Ensminger et al., 2006). Соответственно, изменение положения хлоропластов при холоде снижает вероятность окислительного стресса.

В последние годы появились данные о том, что фототропины участвуют не только в немедленных световых реакциях, но и в суточной адаптации растений к температурным колебаниям. Показано, что фототропин 2 участвует в явлении «холодового праймирования», при котором ночное понижение температуры усиливает реакции на синий свет в утренние часы, заключающиеся в проявлении фототропизма и открывании устьиц (Noguchi et al., 2025). Фототропины являются основными рецепторами синего света в замыкающих клетках устьиц и участвуют в регуляции активности плазматической H^+-АТФазы и ионного транспорта (Inoue et al., 2008). Температура оказывает существенное влияние на устьичные реакции, изменяя потребность растения в транспирации (Hofmann et al., 2025). В этом контексте фототропины рассматриваются как элементы интеграции световых и температурных сигналов, хотя их роль в прямой терморецепции устьичных движений пока остаётся недостаточно охарактеризованной.

Эволюционная консервативность фототропинов и наличие однокопийных форм у примитивных наземных растений указывают на древнее происхождение их функций (Komatsu et al., 2014). Вероятно, способность фототропинов «чувствовать» температуру через фотохимию LOV-доменов является физически обусловленным свойством белка, которое могло быть использовано в ходе эволюции для повышения адаптивности к меняющимся условиям освещённости и температуры (Fujii et al., 2017).

Таким образом, фототропины представляют собой не только рецепторы синего света, но и потенциальные молекулярные термосенсоры, способные участвовать в восприятии температуры у растений. Наиболее убедительные доказательства их терморецепторной функции получены для процессов перемещения хлоропластов, где температура кодируется временем жизни фотоактивированного состояния рецептора (Fujii et al., 2017). Для покрытосеменных растений появляются данные о роли фототропинов в суточной холодовой адаптации и праймировании световых ответов (Noguchi et al., 2025), что позволяет рассматривать фототропины как важные элементы интеграции световых и температурных сигналов наряду с фитохром-зависимыми механизмами терморецепции. Еще раз подчеркнем, что, несмотря на все вышеописанные механизмы косвенной (фитохромы) или прямой (фототропины) терморецепции, в обоих случаях речь идет о регуляции адаптационных процессов в нестрессовом диапазоне температур.

Низкотемпературный стресс у растений обычно делят на два типа: воздействие низких положительных и отрицательных температур (Levitt, 1980; Joshi et al., 2018). В данной работе мы сосредотачиваемся на стрессовом воздействии низких положительных температур, которое называется холодовым. Основной вред от холодового стресса связан с повреждением мембран, что сразу же нарушает процессы фотосинтеза и дыхания (Yadav et al., 2010). Текучесть мембран зависит от состава ЖК. Насыщенные ЖК уплотняются при снижении температуры быстрее, тогда как ненасыщенные, благодаря изгибам в структуре молекулы, замедляют этот процесс и препятствуют чрезмерной ригидизации мембран. Поддержание оптимальной текучести критически важно: она обеспечивает нормальную работу мембранных белков, ионный транспорт и общий клеточный гомеостаз.

Существует предположение, что мембраны у высших растений могут играть не только роль мишени холодового повреждения, но могут выступать и первичными рецепторами низких температур. Данная гипотеза сформулирована по аналогии с доказанным механизмом рецепции холодового стресса у цианобактерий. Для цианобактерий показано, что именно изменение текучести мембраны при понижении температуры окружающей среды является первичным сенсором холода и запускает все дальнейшие адаптационные процессы. У высших растений изменение вязкости цитоплазматической мембраны, может инициировать различные сигнальные механизмы, включая активацию Ca^{2+}-каналов и экспрессию COR-генов. Несмотря на имеющиеся знания, основная научная проблема заключается в ограниченном понимании механизмов

восприятия и реакции растений на холодовой стресс, в частности — роли текучести плазматической мембраны как возможного первичного датчика низких температур.

В данной работе проверяется гипотеза о роли текучести плазматической мембраны как возможного первичного сенсора холодового стресса у высших растений. Для этого сравнивается текучесть плазматических мембран в динамике холодового воздействия для двух видов томата, которые контрастны по восприятию холодового воздействия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Объекты исследования.

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.

2. Воздействие низких температур.

Для постановки эксперимента шестинедельные растения переносили в камеру, поддерживающую температуру +6 °C. Холодовой стресс продолжался 48 часов. Условия освещённости и фотопериод при этом оставались идентичными контрольным. Отбор образцов листьев выполняли поэтапно во временной динамике: в исходных условиях (0 ч), через 0,3 ч (20 минут), 1 час и 2 часа после начала холодового стресса, далее спустя 48 часов непрерывного воздействия холода. Для изучения восстановительных процессов растения возвращали в стандартные условия на 48 часов, после чего отбирали материал (96 ч от начала опыта). Листья сразу погружали в жидкий азот и сохраняли при –80 °C до последующих анализов. Такой дизайн позволял исследовать как быстрый ответ на холод, так и изменения в фазе восстановления. Для получения профиля ЖК свежесобранный материал сразу фиксировали в кипящем изопропаноле.

3. Оценка фотохимической активности фотосистемы II.

Эффективный фотохимический квантовый выход ФС II (Y(II)) является распространённым способом оценки способности фотосинтетического аппарата адаптироваться к стрессовым условиям (Nosenko et al., 2016, Angmo et al., 2023, Xia Q. et al., 2023). Измерение Y(II) проводилось методом флуориметрии с амплитудно-импульсной модуляцией с использованием флуориметра MINI-PAM-II (Heinz Waltz GmbH, Германия).

Измерения были проведены на неповрежденных листьях растений, подвергнутых воздействию постоянного света, составляющего около 400 мкмоль*м$^{-2}$*с$^{-1}$. Интенсивность импульса насыщающего света составляла 10 000 мкмоль*м$^{-2}$*с$^{-1}$. Мы использовали листья со второго по четвертый ярусы. Листья с признаками некроза в анализ не брали. Каждое растение было подвергнуто 4-5 независимым измерениям. Параметр флуоресценции хлорофилла Y(II) пропорционален поглощенной световой энергии, используемой для фотохимии при заданной интенсивности света (Lazar, 1999; Murata et al., 2007; Toth et al., 2007; Baker et al., 2008; Stirbet et al., 2011; Stirbet et al., 2012; Kalaji et al., 2014). Высокое значение Y(II) (близкое к 0,8 при оптимальных условиях) указывает на эффективное фотохимическое преобразование энергии. Снижение Y(II) свидетельствует об ингибировании фотохимической активности ФС II в условиях воздействия окружающей среды.

4. Определение степени утечки электролитов.

10 высечек листьев диаметром 8 мм три раза отмывали в 50 мл MiliQ по 3 мин. Инкубировали в 25 мл MiliQ 22 ч при +4 °С в темноте. По прошествии 22 ч доводили температуру раствора до +25 °С и измеряли электропроводность (L1) с помощью кондуктометра CONDUCTOMETR TYPE OK-104 (Radelkis Budapest, Венгрия). Для полного разрушения клеток пробы доводили до кипения с последующим охлаждением на льду до +25 °С, после чего вновь измеряли электропроводность (L2). Степень утечки электролитов (УЭ) рассчитывали по формуле УЭ = 100*(L1/L2).

5. Выделение фракций цитоплазматических мембран, тилакоидных мембран и мембран внутриклеточных органелл.

Все процедуры проводили при температуре +4 °С в холодной комнате. К навеске листьев добавляли троекратный объем среды гомогенизации (300 мМ сахароза, 100 мМ Трис-HCl pH 8,0, 10 мМ ЭДТА, 0,6% ПВП, 5 мМ $K_2S_2O_5$, 5 мМ ДТТ, 1 мМ PMSF). Гомогенизировали в блендере на 14000 об./мин по 30 сек 3 раза с перерывом 30 сек. Полученный гомогенат фильтровали через 2 слоя батиста с последующим центрифугированием (№1) 1000 g 5 мин. На данном этапе происходит осаждение тилакоидных мембран. Осадок растворяли в 10 мл среды суспендирования (300 мМ сахароза, 5 мМ MES-БТП, pH 7,2, 5 мМ ДТТ, 0,5 мМ ЭДТА) и, таким образом, получали суспензию тилакоидных мембран. Супернатант повторно центрифугировали (№2) при 10000 g 10 мин для отделения микросомальной фракции от мембран ядер и митохондрий. Осадок отбрасывали, а супернатант центрифугировали (№ 3) на ультрацентрифуге

(100000 g 30 мин). Осадок, полученный после центрифугирования на высоких оборотах, ресупендировали в 12 мл фазового буфера (5мМ КФБ, pH 7,8, 0,3 М сахароза, 3 мМ KCl, 0,1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ) и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера. Полученный гомогенат, содержащий смесь цитоплазматических мембран и мембран органелл, подвергали разделению в двух фазной смеси ПЭГ-декстран (6,2 % декстран Т500, 6,2 % ПЭГ 3350 в фазовом буфере). Для этого к 25 мл фазовой смеси добавляли 12 мл гомогената. Тщательно перемешивали образовавшуюся смесь (20 раз путем интенсивного встряхивания пробирки) и центрифугировали (№4) 2500 g 5 мин. Верхнюю фазу, содержащую ПЭГ с плазматической мембраной (ПМ), аккуратно отбирали и разводили в 10 раз средой суспендирования, после чего центрифугировали (№5) при 100000 g 30 мин. Осадок ПМ растворяли в 800 мкл среды суспендирования. Полученную суспензию использовали для проведения ЭПР-анализа, позволяющего оценить текучесть ПМ. Нижнюю фазу, образовавшуюся после центрифугирования №4 и содержащую декстран с мембранами эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи и тонопласта, центрифугировали при 100000 g 30 мин (№6), после чего осадок забирали на анализ в качестве фракции «мембран внутриклеточных органелл» или эндомембран. Протокол выделения представлен на рис. 2. Оценку качества разделения мембран проводили на основании анализа ферментативной активности H^+-АТФаз P- и V-типов в разных фракциях.

Описанный метод фракционирования мембран, включающий дифференциальное ультрацентрифугирование с последующим разделением микросомальной фракции в водной двухфазной системе ПЭГ–декстран, является классическим и широко апробированным способом получения обогащённой фракции плазматической мембраны. Данная методика подробно описана в учебных и методических изданиях (Романов и др., 2019), а также систематически применяется в современных исследованиях по биохимии и физиологии растений (Alexandersson et al., 2004, Lapshin et al., 2021). Высокая воспроизводимость и надёжность метода, подтверждённая авторами оригинальной методики и многочисленными последующими работами (Larsson et al. 1994, Lapshin et al., 2021), позволяют рассматривать его как стандартный подход к выделению плазмалеммы из растительного материала. В связи с этим в настоящем исследовании дополнительная валидация иммунологическими методами не проводилась. Контроль успешности фракционирования и степени обогащённости плазмалеммной фракции плазмалеммой осуществляли посредством определения активности ферментативных маркеров, специфичных для ПМ и микросомальной фракции. Сопоставление распределения маркерных активностей между фракциями позволило подтвердить корректность

проведённого разделения и адекватность полученной плазмалемной фракции для последующего ЭПР анализа.

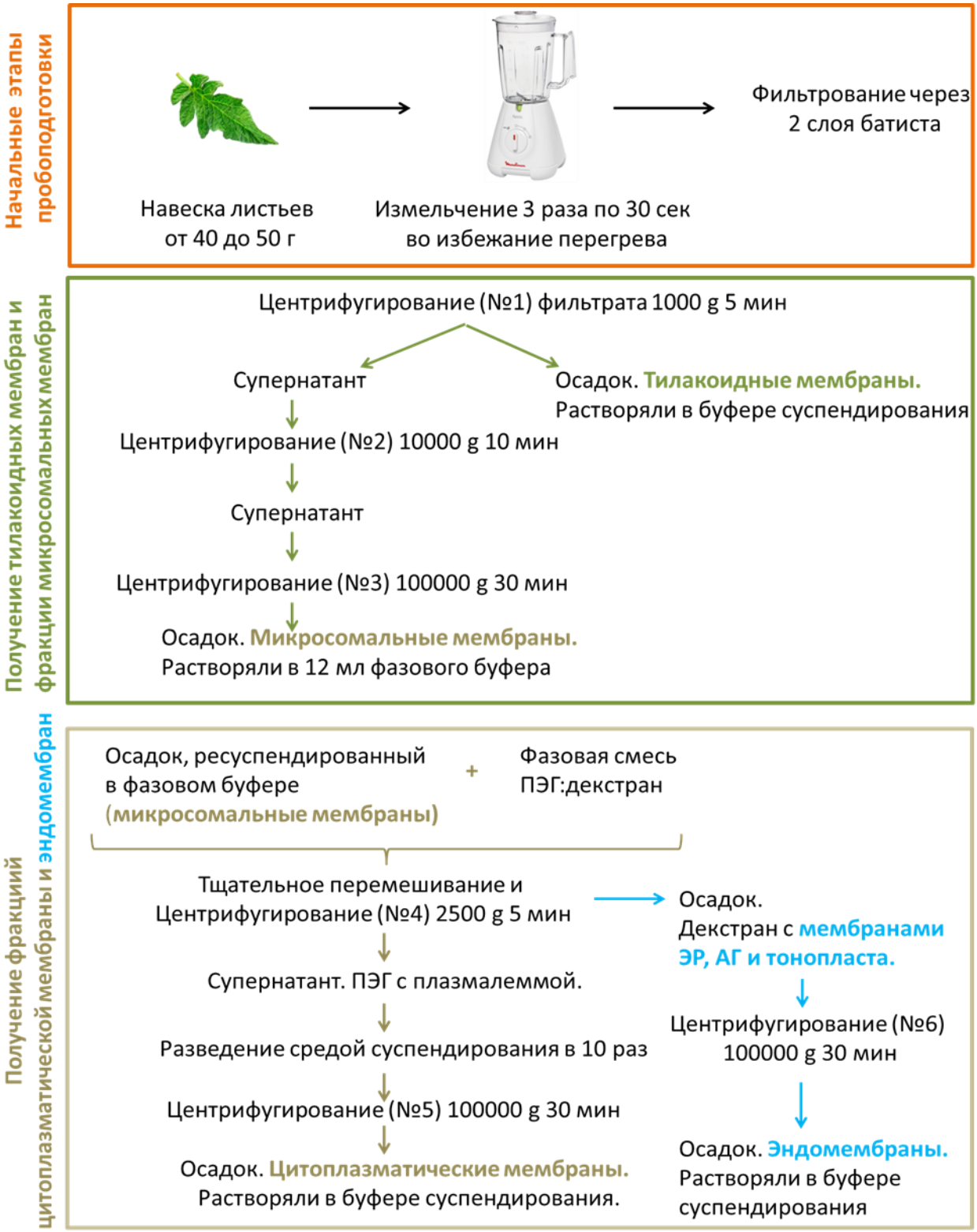

Рис. 2 — Схема выделения фракции цитоплазматической мембраны из листьев томата

6. Оценка степени обогащения плазмалемной фракции плазматической мембраной методом определения активности маркерных ферментов.

Для определения степени обогащенности полученных препаратов плазматической мембраной проводили сравнение активностей маркерных ферментов во фракциях плазмалеммы (осадок после центрифугирования №5), эндомембран (осадок после центрифугирования №6) и исходных микросомальных мембранах (осадок после центрифугирования №3). В качестве маркерного фермента плазмалеммы анализировалась активность ортованадат-ингибируемой H^+-АТФазы (Р-тип), в качестве маркерного фермента микросомальной фракции - нитрат-ингибируемой H^+-АТФазы тонопласта (V-типа) (Романов и др., 2019). Активность H^+-АТФаз оценивали по количеству окисленного НАДН в сопряженной АТФ-регенерирующей системе (Романов и др., 2019). Для этого в 1-см кювету спектрофотометра вносили 1,9 мл основной среды, содержащей 100 мМ KCl, 10 мМ MES-БТП, pH 7,8 (для H^+-АТФазы V-типа) или pH 6,5 (для H^+-АТФазы Р-типа), суспензию везикул (содержание белка 20–50 мкг), 50 мкл 10 мМ НАДН, 20 мкл 100 мМ фосфоенолпирувата, 40 мкл 50 мМ АТФ и 5 мкл смеси ферментов пируваткиназы и лактатдегидрогеназы («Sigma», США). Реакцию гидролиза АТФ запускали внесением 8 мкл 1 М $MgSO_4$ и регистрировали кинетику окисления НАДН на спектрофотометре при 340 нм. Коэффициент молярной экстинкции НАДН при расчетах составлял 6,2 $мМ^{-1}*см^{-1}$. Для анализа специфического ингибирования реакцию проводили в присутствии и в отсутствие ингибиторов: 100 мкМ ортованадата натрия для H^+-АТФазы Р-типа и 10 мМ KNO_3 для H^+-АТФазы V-типа.

7. **Экстракция и дериватизация жирных кислот.**

При выделении тотальных ЖК из листьев экстракцию проводили по методике, указанной в статье Ивановой с соавт. (Ivanova, et al., 2023). К навеске листьев, равной 1 г, добавляли 30 мл хлороформа и перемешивали 3 мин для удаления поверхностных восков. Пробы фиксировали в кипящем изопропаноле, содержавшем 0.001% ионола (butylated hydroxytoluene 34750 “Sigma-Aldrich”, Германия) в качестве антиоксиданта в течение 30 мин. Растительный материал гомогенизировали в ступке и полностью экстрагировали суммарные липиды с использованием хлороформа и метанола в двух системах – нейтральной [хлороформ:метанол:вода (300:200:1)] и кислой [хлороформ:метанол:HNO_3 (400:200:2)]. Экстракт доводили до объема 200 мл и добавляли аммиак до нейтральной реакции. Далее аликвоту экстракта суммарных липидов (в качестве внутреннего стандарта добавляли известное количество маргариновой кислоты (17:0)) подвергали щелочному гидролизу в 4% этанольном растворе NaOH, неомыляемые вещества отделяли гексаном

методом декантации и более в работе не использовали. Далее раствор доводили до кислой реакции, ЖК экстрагировали гексаном и конвертировали в метиловые эфиры ЖК (МЭЖК) кипячением с обратным холодильником с использованием метанола и ацетилхлорида. МЭЖК выделяли гексаном, выпаривали на ротационном испарителе и добавляли минимальный объем растворителя. Для получения чистых МЭЖК использовали фракционирование методом препаративной тонкослойной хроматографии на пластинах 150 × 150 мм (“Силуфол”, Чехия) в системе гексан : диэтиловый эфир : уксусная кислота – 8 : 2 : 0.1. Зону чистых МЭЖК обнаруживали в УФ-свете при длине волны 365 нм на пластине после обработке 0.001% водноспиртовом раствором дихлорфлюоресцеина. При выделении ЖК из фракционированных мембранных образцов процедура была аналогична описанной выше за исключением того, что выделение начиналось с того, что в полученных после выделения мембранных фракций суспензиях плазматических мембран, тилакоидных мембран и мембран клеточных органелл (см. п. 2.5) проводили выпаривание растворителя на вакуумном испарителе (температура воды составляла +40 °C). Далее к оставшемуся в колбе сухому веществу добавляли 4% NaOH (спирт:вода, 1:1) и действовали по протоколу, описанному выше.

8. Газожидкостная хроматография–масс-спектрометрия (ГЖХ-МС).

Идентификацию и количественное определение МЭЖК проводили методом ГЖХ-МС на приборе Agilent 7890FGC (“Agilent Technologies Inc.”, США) с 60-метровой капиллярной колонкой с внутренним диаметром 0.25 мм. Условия разделения МЭЖК: давление газа-носителя (гелия) в инжекторе – 191 кПа; рабочее давление газа в колонке – 245 кПа; расход газа – 1 мл/мин; линейная скорость газа-носителя в колонке – 18 см/с; объем раствора образца – 1 мкл (около 10 мкг МЭЖК); делитель потока – 1:5, температура испарителя 260°C. Программа градиента температуры колонки: от 130 до 170°C со скоростью 6.5°C/мин, от 170 до 215°C со скоростью 2.75°C/мин, выдержка при 215°C в течение 25 мин, от 215 до 240°C со скоростью 40°C/мин и выдержка при 240°C в течение 50 мин. Рабочая температура МС-детектора – 240°C. Для идентификации индивидуальных видов МЭЖК и расчета их количественного содержания в смесях использовали расширенный пакет встроенных рабочих программ MSD ChemStation с библиотекой спектров NIST.

9. Экстракция РНК и обратная транскрипция.

Листья томатов измельчали в жидком азоте. Выделение РНК проводили с использованием набора GeneJET Plant RNAPurification Mini Kit (AppliedBioSystems, США), руководствуясь инструкцией производителя.

Обратную транскрипцию проводили с использованием MMLV ревертазы. Для получения первой цепи кДНК использовали протокол MMLV RT Kit (Evrogen, Россия). Кратко, готовили смесь, состоящую из РНК-матрицы (500 нг) и oligo(dT)-праймеров, которую прогревали 2 мин при 70°С, после чего добавляли заранее подготовленную смесь MMLV-ревертазы, буфера, dNTPs и ДТТ. Инкубировали 45 мин при 39°С. Для остановки реакции смесь прогревали 10 мин при 70°С. Полученные таким образом образцы кДНК использовали для постановки ПЦР-РВ.

10. Анализ уровня транскриптов *CBF(C–box binding factor)*-генов.

Метод ПЦР-РВ использовали для сравнительной относительной оценки уровней транскриптов генов *CBF1 (NM_001247194.2), CBF2 (AY497899.1), CBF3 (MF095101.1)* в листьях томатов, подвергнутых холодовому стрессу. Подбор праймеров производили с помощью программы NCBI PrimerBlast. Для уровня транскриптов целевых генов использовали сравнительный Ct-метод. Расчет величины ΔΔCt достоверен только в случае равной эффективности амплификации мишени и эндогенного контроля или при введении поправки на разность в эффективности, если она есть. Чтобы установить значения эффективности заранее строили графики зависимости порогового цикла от исходной концентрации матрицы при определении содержания мишени и эндогенного контроля. Амплификация выполнялась на приборе QuantStudio 1 (Applied Biosystems, США). Для приготовления проб использовали готовую смесь для ПЦР qPCRmix-HS SYBR (Evrogen, Россия). Реакционная смесь (25 мкл) содержала 4 мкл SYBR, 1 μM каждого праймера и около 10 нг матрицы кДНК. Использовали следующие условия амплификации: 95°С – 5 мин, далее 45 повторений цикла 95°С – 15 с, 60°С - 15 с, 72°С- 30 с. Для возможности анализа специфичности образовавшихся продуктов проводили плавление образовавшихся дуплексов при условиях: 95°С – 10 с, 65°С – 1 мин, 95 – 1 с. Три повторности ПЦР-РВ и значения Ct были использованы для количественной оценки уровня транскриптов. Отрицательный контроль для каждой пары праймеров содержал все компоненты, за исключением матрицы кДНК. Результаты амплификации обрабатывались с использованием программного обеспечения QuantStudio Design and Analysis Software v2.5. В качестве референсных генов в экспериментах по устойчивости к холодовому стрессу были выбраны гены *RPL2* (X64562.1) (Ribosomal Protein L2, кодирует рибосомный белок

L2) и *PP2Acs* (AY325817) (Protein Phosphatase 2A, кодирует каталитическую субъединицу протеинфосфатазы 2А). Выбор данных генов был определён анализом литературы и нашими экспериментальными наблюдениями. Так в статье Lovdal с соавт., исследовали варианты генов, которые могли бы использоваться в качестве референсных при изучении холодового стресса томатов (Lovdal et al., 2009). Важно, что в данной работе использовали листовой материал. С использованием алгоритма geNorm авторы показали, что наиболее подходящими будут гены ***RPL2, EF1.*** Поставленные нами эксперименты показывают, что гены ***RPL2*** и *PP2Acs* дают сходные результаты и могут быть использованы в качестве референсных. Последовательности праймеров, использовавшихся для ПЦР-РВ указаны в таблице 1.

Таблица 1 ― Праймеры, используемые для проведения ПЦР-РВ

Праймер	Последовательность
CBF1_For	ACGTCAGAAAATGTGCAAGAGA
CBF1_Rev	CATGTAGGCATCAGTTTCCACAC
CBF3_For	TGCCGGGTTTACTTACGAAT
CBF3_Rev	TCAGCTTCCACATGATCTCC
CBF2_For	TTCGATCGGAAGAAGTTTCA
CBF2_Rev	CAAGTAATCCTGGCATGGAA
RPL2_For	GTCATCCTTTCAGGTACAAGCA
RPL2_Rev	CGTTACAAACAACAGCTCCTTC

11. Анализ текучести плазматической мембраны методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР).

Текучесть плазматической мембраны оценивали методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) с использованием липофильного спинового зонда 5-доксилстеарата (5-ДС; Sigma–Aldrich, США). Параметр спектра ЭПР ΔH_{max} (подробности см. ниже) фиксировали в качестве показателя микровязкости липидной мембраны (Jost et al., 1971; Keith et al., 1973; Lyutova et al., 1988; Tikhonov et al., 2005). Спектры ЭПР регистрировали на Q-диапазонном спектрометре E-4 (Varian Inc., США) при мощности СВЧ-излучения 10 мВт и амплитуде высокополевой модуляции 4 G. К 50 мкл суспензии липосом, полученных после выделения плазматической мембраны, добавляли 2 мкл 10 мМ метки 5-ДС в этаноле. Конечная концентрация метки в пробе составила 400 мкМ, концентрация этанола 4%. После чего суспензию помещали в кварцевую трубку резонатора.

Температуру проб, помещённых в кварцевую трубку внутри резонатора, контролировали с помощью температурного регулятора Varian.

12. Статистический анализ.

Все эксперименты были выполнены минимум в трёх биологических повторностях. Результаты представлены в виде средних значений ± стандартное отклонение. В случае нормального распределения выборок и гомогенности дисперсии для оценки достоверности различий использовали дисперсионный анализ (ANOVA), с последующим применением критерия 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

1. Визуальная оценка состояния растений по ходу эксперимента.

Визуальная оценка позволила выявить следующие фенотипические реакции на холодовой стресс (+6 °C). У сорта MoneyMaker не наблюдалось существенных изменений после одного дня пребывания в стрессовых условиях, за исключением небольшой потери тургора (рис. 3А). Через два дня повреждения стали более выраженным. На некоторых листьях была заметна потеря тургора, сопровождавшаяся появлением хлороза на определенных участках листьев. После двухдневного периода восстановления тургор частично восстановился, а процент поражений хлорозом не увеличился. Сорт Micro-Tom продемонстрировал в основном схожую реакцию (рис. 3Б). Незначительные различия между сортами стали очевидны после второго дня воздействия холодового стресса. У сорта Micro-Tom наблюдалась заметная потеря тургора и потемнение нижних ярусов листовых пластинок, чего не наблюдалось у сорта MoneyMaker. В остальном визуальное проявление признаков стресса у двух сортов *S. lycopersicum* было в значительной степени сопоставимым. В отличие от этого, у *S. lycopersicoides* не было выявлено видимых фенотипических изменений в ответ на двухдневное воздействие низкой температуры (рис. 3В, Milovskaya et al., 2025).

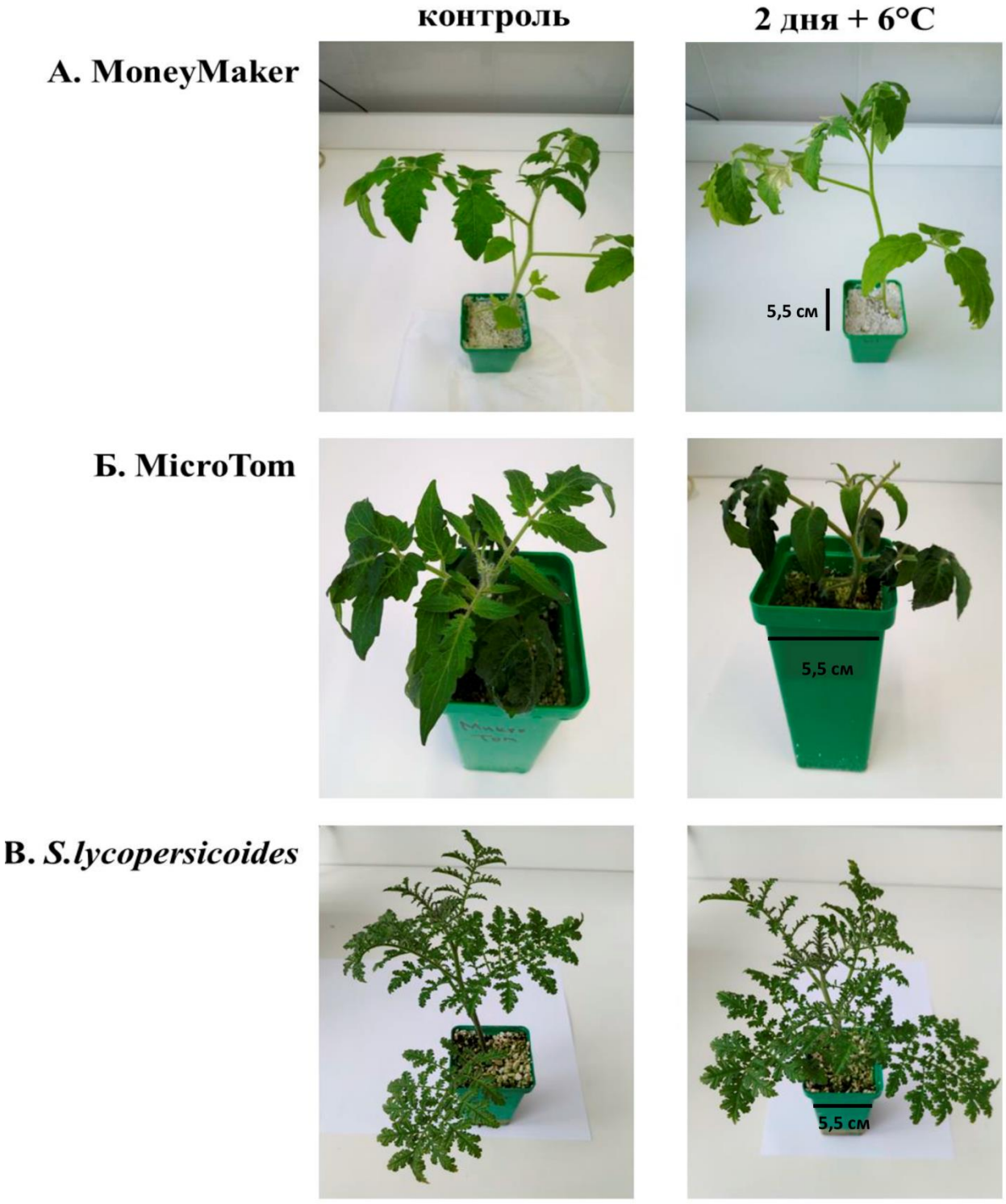

Рис. 3 — Фенотипы растений сортов MoneyMaker (A), Micro-Tom (Б) и дикого вида *S. lycopersicoides* (B) в контрольных условиях и после 2 дней холодового воздействия (+ 6 °C)

2. Оценка степени утечки электролитов.

Одним из параметров, использовавшимся в качестве оценки интенсивности повреждения от воздействия холода, был показатель утечки электролитов. Причина повышения степени утечки электролитов при стрессе связана с активацией калиевых каналов (кодируются генами *GORK* и *SKOR).* Вызванная стрессом утечка электролитов всегда сопровождается образованием АФК и часто приводит к программируемой клеточной гибели. Эти явления связаны между собой: АФК (гидроксильные радикалы и H_2O_2) способны активировать GORK и SKOR, вызывающие отток K^+ из растительных клеток. Помимо АФК, важную роль в активации K^+-каналов играют ионы Ca^{2+}, поступающие в клетку при стрессе. В нормальных условиях ионы калия блокируют внутриклеточные протеазы и эндонуклеазы. Их отток стимулирует работу этих гидролитических ферментов, что и приводит к программируемой клеточной гибели. Однако при умеренном стрессе выход K^+ из клетки может играть роль переключателя метаболизма, являясь сигналом, который снижает скорость анаболических реакций и стимулирует катаболические процессы, вызывая высвобождение энергии для адаптации и восстановления организма (Demidchik et al., 2014). Показатель утечки электролитов очень часто используют как маркер повреждающего воздействия на клетки (Han et al., 2020). Так, сообщалось, что для растений томата степень утечки электролитов возрастала вдвое после 1 суток выдерживания на +4 °C (Kim et al., 2020). В другом исследовании авторы показали, что степень утечки электролитов возрастала вдвое по окончании 48 ч инкубации на холоду (Ding et al., 2017). На рис. 4А приведены значения данного показателя в течение 2 суток воздействия температуры +4 °C для двух сравниваемых сортов томатов (Milovskaya et al., 2025).

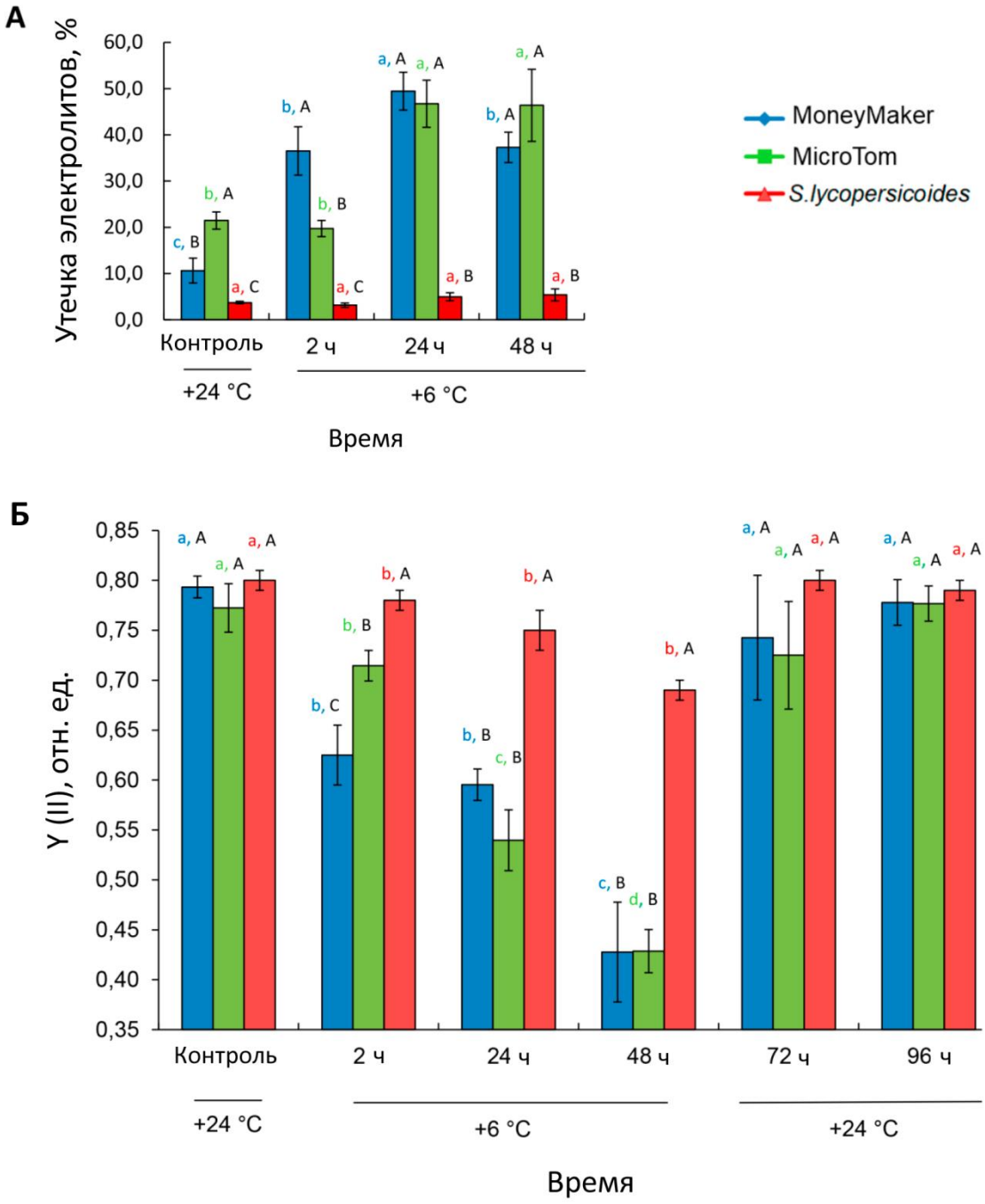

Рис. 4 — (А) Анализ степени утечки электролитов (%) из листьев *S. lycopersicum* и *S. lycopersicoides* в течение 48 часов воздействия холода. (Б) Эффективный квантовый выход фотосистемы II (Y(II)) у исследуемых томатов *S. lycopersicum* (сорта MoneyMaker и Micro-Tom) и *S. lycopersicoides* при воздействии холодового стресса 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)

Для *S. lycopersicoides* показатель степени утечки электролитов не изменяется относительно контроля в течение всего периода воздействия стресса. Для сорта Micro-Tom мы начинали наблюдать различия в степени утечки электролитов только через 1 сутки воздействия холода по сравнению с контролем, для MoneyMaker исследуемый параметр начинал отличаться от контрольных значений уже по прошествии 2 часов. По прошествии 2 дней холодового воздействия оба сорта все еще демонстрировали отличия в утечке электролитов от контрольных значений, однако между сортами различий не было. Можно заключить, что *S. lycopersicum* (сорт MoneyMaker, сорт Micro-Tom) испытывает повреждающее воздействие холода и реагирует на стресс нарушением проницаемости мембран. Нарушений проницаемости мембран *S. lycopersicoides* при таком же воздействии не наблюдается. При этом при сравнении сортов между собой Micro-Tom на ранних этапах холодового воздействия демонстрирует большую устойчивость по сравнению с MoneyMaker. По данным анализа степени утечки электролитов *S. lycopersicoides*, в отличие от *S. lycopersicum* показывает себя, как толерантный к холодовому стрессу вид (Milovskaya et al., 2025).

3. Оценка степени повреждения фотосистемы II.

Для оценки повреждающего действия холода на фотосинтетический аппарат проводили измерение флуоресценции хлорофилла с помощью PAM-флуориметра MINI-PAM II (компания Walz, Германия). Квантовый выход ФС II является стандартным показателем для оценки врожденной или приобретенной способности растения противостоять повреждениям фотосинтетического аппарата, вызванным низкотемпературным стрессом. Значения квантового выхода ФС II представлены на рис. 4Б. По результатам PAM-анализа показано, что все три типа томатов демонстрируют изменения в работе фотосинтетического аппарата уже по прошествии 2 часов холодового воздействия. Однако степень выраженности повреждений разная: наибольшая у сорта MoneyMaker, чуть меньше для сорта Micro-Tom, наиболее устойчив вид *S. lycopersicoides*. Через 2 суток воздействия холода для перуанского вида не наблюдается увеличение степени повреждения, а показатель для Micro-Tom сравнивается с таковым для MoneyMaker. Оба сорта *S. lycopersicum* значительно теряют в эффективности работы ФС II по сравнению с *S. lycopersicoides*. По прошествии суток пребывания в нормальных условиях все образцы восстанавливают контрольные показатели. Таким образом, *S. lycopersicoides* демонстрирует наибольшую устойчивость фотосинтетического аппарата среди трех типов томата. Micro-Tom более устойчив по сравнению MoneyMaker на

начальных этапах холодового воздействия, однако затем степень повреждения двух сортов становится одинаковой (Milovskaya et al., 2025).

4. Анализ уровня транскриптов *CBF(C–box binding factor)*-генов.

Гены *CBF* являются ключевыми ТФ, задействованными в ответе на ходовой стресс. Данные гены различаются по выраженности экспрессии у теплолюбивых и холодоустойчивых сортов, в связи с чем, анализ уровня их транскриптов является важной информацией при характеристике стрессоустойчивости. В нашем эксперименте мы наблюдали повышение уровня транскриптов генов всех трех транскрипционных факторов (*CBF1*, *CBF2* и *CBF3*) в ответ на действие холода у всех типов исследуемых томатов, однако при сравнении между типами наблюдались существенные различия (рис. 5 и 6).

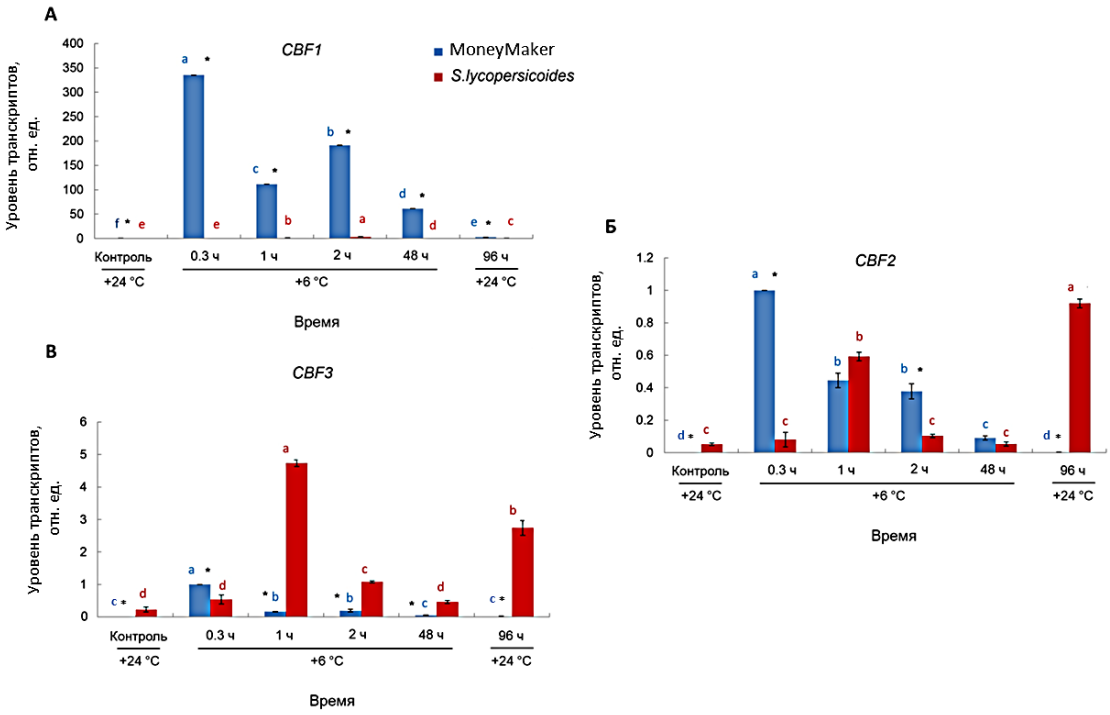

Рис. 5 — Уровень транскриптов генов *CBF1* (А), *CBF2* (Б), *CBF3* (В) в образцах листьев томата *S. lycopersicum* (сорт MoneyMaker) и *S. lycopersicoides* в течение эксперимента. За единицу везде, кроме как для *CBF1*, принят уровень транскриптов исследуемого гена у *S. lycopersicum* сорт MoneyMaker 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)

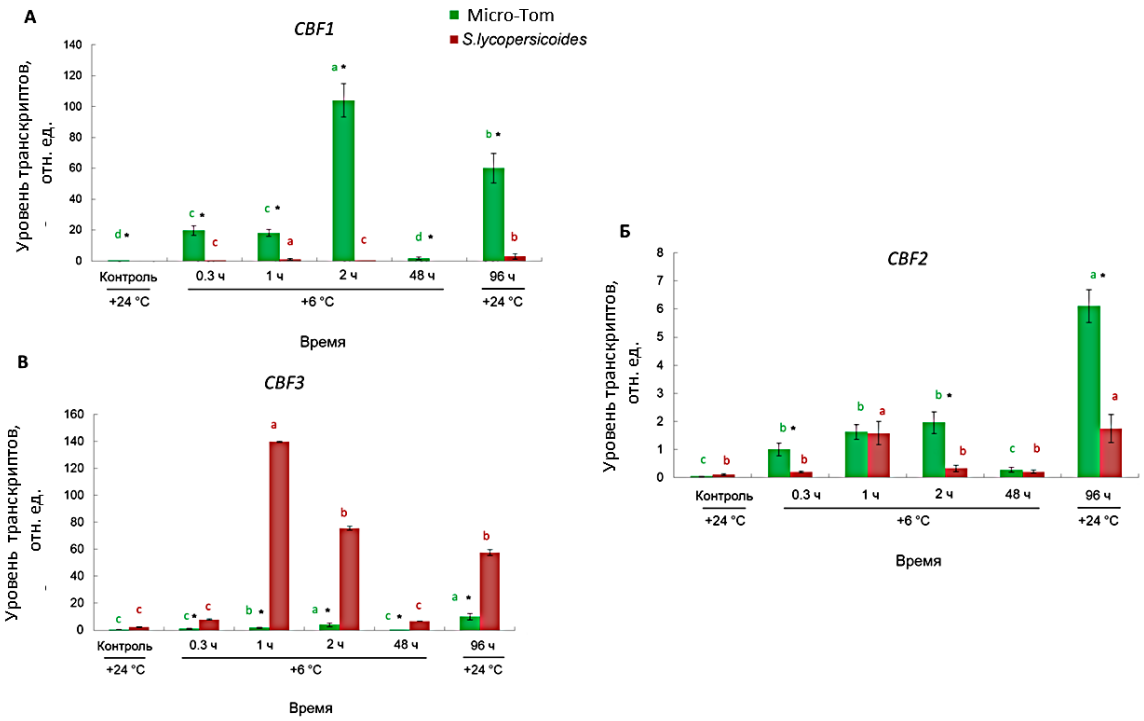

Рис. 6 — Уровень транскриптов генов *CBF1* (А), *CBF2* (Б), *CBF3* (В) в образцах листьев томата *S. lycopersicum* (сорт Micro-Tom) и *S. lycopersicoides* в течение эксперимента. За единицу везде, кроме как для *CBF1*, принимали уровень транскриптов исследуемого гена у *S. lycopersicum* сорт Micro-Tom 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)

Уровень транскриптов *CBF1*, который является маркером чувствительности к холодовому стрессу, у обоих сортов *S. lycopersicum* (сорт MoneyMaker, сорт Micro-Tom) превышает таковой у *S. lycopersicoides.* Уровень транскриптов *CBF2* сопоставим у всех трех исследуемых образцов томатов. Уровень транскрипта *CBF3* – гена, который, наоборот, в отличие от *CBF1*, ассоциируется с устойчивостью, был выше у *S. lycopersicoides.* Эта тенденция свойственна, как в отношении MoneyMaker, так и Micro-Tom. Таким образом, по характеру изменений уровней транскриптов генов *CBF* MoneyMaker и Micro-Tom демонстрируют схожие закономерности при сравнении с *S. lycopersicoides:* повышенный уровень транскриптов *CBF1*, сходный уровень *CBF2*, и

меньший *CBF3*. Сравнивая уровни транскриптов генов *CBF* у трех томатов, важно отметить, что время, при котором наблюдается максимальный уровень транскриптов, для всех *CBF у* MoneyMaker составляет 20 мин от начала холодового воздействия, тогда как для Micro-Tom и *S. lycopersicoides* пик приходится на более позднее время – 1 час или 2 часа соответственно. Еще одной особенностью, которая роднит Micro-Tom и *S. lycopersicoides* является наличие значительных показателей уровней транскрипции в период восстановления, что не наблюдается для MoneyMaker (Milovskaya et al., 2025).

5. Анализ тотального жирнокислотного состава листьев трех генотипов во временной динамике холодового воздействия.

В данной работе мы проводили два типа ЖК-анализа. Первый тип представлял собой анализ тотального содержания ЖК в листьях во временной динамике холодового стресса и последующего восстановления (в контрольных образцах, через 48 часов холодового воздействия, через 48 часов восстановления). Поскольку здесь не было произведено фракционирование клеточных органелл, анализ имел целью проследить изменение ЖК-профиля клеток при воздействии низкотемпературного стресса в общем. Второй тип представлял собой анализ ЖК-состав разных клеточных органелл (ПМ, тилакоидной мембраны, мембран аппарата Гольджи и эндоплазматического ретикулума) в контрольных условиях, и о его результатах речь пойдет в подразделе 6.

Для определения процентного содержания различных ЖК в листьях использовали метод ГЖХ-МС. Результаты ЖК-анализа представлены на рис. 7 и 8 в виде процентного содержания конкретной ЖК от общего количества детектированных ЖК. Статистический анализ выполнен в программе RStudio. Для поиска различий между группами применяли кр. Тьюки (если была подтверждена нормальность выборки) или кр. Краскела-Уоллиса (в случае если выборки были не из нормального распределения).

Жирная кислота	*S. lycopersicum*						*S. lycopersicoides*		
	ММ			МТ					
	Контроль	48 ч +6°C	48 ч +24°C	Контроль	48 ч +6°C	48 ч +24°C	Контроль	48 ч +6°C	48 ч +24°C
Миристиновая 14:0	0.20 ± 0.1 a B	0.21 ± 0.04 a B	0.41 ± 0.02 a B	0.32 ± 0.03 a B	0.21 ± 0.01 a B	0.50 ± 0.1 a A	0.80 ± 0.1 a A	0.80 ± 0.1 a A	0.60 ± 0.2 a A
Пентадекановая 15:0	0.20 ± 0.1 b B	0.42 ± 0.02 b B	0.70 ± 0.2 a A	0.71 ± 0.03 a A	0.00	0.60 ± 0.1 a A	0.80 ± 0.1 a A	0.70 ± 0.1 a A	0.00
Пальмитиновая 16:0	21.00 ± 0.7 a A	22.00 ± 0.2 a A	22.20 ± 0.3 a B	17.70 ± 0.1 c B	20.40 ± 0.1 b A	26.80 ± 1.1 a A	19.30 ± 1.3 a A	19.10 ± 0.7 a A	19.40 ± 1.6 a C
7-гексадеценовая 16:1(7)	1.90 ± 0.3 a A	2.50 ± 0.1 a A	2.31 ± 0.02 a A	2.20 ± 0.1 a A	2.30 ± 0.1 a A	2.90 ± 0.3 a A	1.80 ± 0.1 a A	2.40 ± 0.4 a A	1.90 ± 0.2 a A
Пальмитолеиновая 16:1(9)	0.42 ± 0.04 a A	0.51 ± 0.02 a A	0.50 ± 0.1 a A	0.42 ± 0.02 a A	0.31 ± 0.02 a A	0.41 ± 0.03 a A	0.00	0.00	0.00
14-гексадеценовая 16:1(14)	0.30 ± 0.03 a A	0.33 ± 0.02 a A	0.31 ± 0.04 a A	0.23 ± 0.04 a A	0.22 ± 0.01 a B	0.30 ± 0.1 a A	0.00	0.30 ± 0.1 a A	0.40 ± 0.1 a A
7,10-гексадекадиеновая 16:2(7,10)	0.70 ± 0.4 a A	0.61 ± 0.01 a A	0.00	0.60 ± 0.1 a A	0.51 ± 0.04 a A	0.00	0.40 ± 0.1 A	0.00	0.00
7,10,13-гексадекатриеновая 16:3(7,10,13)	7.10 ± 0.5 a A	8.40 ± 0.5 a A	7.20 ± 0.2 a A	8.20 ± 0.4 a A	7.50 ± 0.1 a A	5.20 ± 0.4 b B	4.60 ± 0.8 a B	6.90 ± 0.5 a A	4.90 ± 0.6 a B
Стеариновая 18:0	2.00 ± 0.3 a B	2.00 ± 0.1 a B	2.41 ± 0.04 a B	1.80 ± 0.2 b B	1.60 ± 0.1 b B	2.60 ± 0.3 a B	3.00 ± 0.2 a A	2.60 ± 0.3 a A	3.90 ± 0.7 a A
Олеиновая 18:1(9)	2.00 ± 0.3 a B	2.40 ± 0.1 a B	1.82 ± 0.03 a B	1.60 ± 0.1 b B	3.10 ± 0.1 a B	2.20 ± 0.3 b B	3.60 ± 0.2 b A	5.80 ± 0.5 a A	3.00 ± 0.6 c A
Вакценовая 18:1(11)	0.50 ± 0.02 a B	0.51 ± 0.02 a B	0.52 ± 0.04 a A	0.60 ± 0.1 a B	0.70 ± 0.1 a A	0.61 ± 0.04 a A	1.20 ± 0.1 a A	0.00	0.70 ± 0.1 b A
Линолевая 18:2(9,12)	18.00 ± 0.2 a A	18.00 ± 0.5 a A	18.30 ± 0.3 a A	17.20 ± 0.4 b A	18.80 ± 0.1 a A	16.70 ± 0.5 b B	11.70 ± 0.2 a B	12.40 ± 0.2 a B	12.90 ± 0.6 a C
10,13-октадекадиеновая 18:2(10,13)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.80 ± 0.3	0.00	0.00	0.00
α-Линоленовая 18:3(9,12,15)	44.30 ± 1.6 a C	39.40 ± 0.1 a C	40.80 ± 0.4 a B	45.90 ± 0.1 a B	41.10 ± 0.2 b B	34.20 ± 1.7 c C	51.30 ± 1.1 a A	47.90 ± 1.1 a A	50.90 ± 2.9 a A
Нонадекановая 19:0	0.20 ± 0.1 a A	0.10 ± 0.01 a A	0.20 ± 0.03 a A	0.20 ± 0.1 a A	0.11 ± 0.02 a A	0.21 ± 0.04 a A	0.21 ± 0.01 a A	0.22 ± 0.02 a A	0.11 ± 0.01 a A
Арахиновая 20:0	0.60 ± 0.1 a A	0.90 ± 0.1 a A	1.00 ± 0.1 a B	0.72 ± 0.05 b A	0.91 ± 0.01 b A	1.10 ± 0.4 a A	0.50 ± 0.1 a A	0.50 ± 0.1 a A	0.70 ± 0.2 a B
11,14-эйкозадиеновая 20:2(11,14)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.32 ± 0.04	0.00	0.00	0.00
11,14,17-эйкозатриеновая 20:3(11,14)	0.00	0.00	0.20 ± 0.0 A	0.00	0.22 ± 0.01 a A	0.11 ± 0.02 a A	0.00	0.00	0.00
Генейкозановая 21:0	0.00	0.00	0.00	0.30 ± 0.03 a	0.30 ± 0.1 a	0.50 ± 0.2 a	0.00	0.00	0.00
Бегеновая 22:0	0.20 ± 0.1 b A	0.50 ± 0.1 b B	0.60 ± 0.1 a B	0.50 ± 0.04 b A	0.60 ± 0.02 b A	0.90 ± 0.2 a A	0.32 ± 0.04 a A	0.21 ± 0.04 a C	0.30 ± 0.1 a C
Трикозановая 23:0	0.00	0.20 ± 0.1 a B	0.33 ± 0.05 a B	0.41 ± 0.02 a A	0.42 ± 0.01 a A	0.00	0.00	0.00	0.00
Лигноцериновая 23:0	0.22 ± 0.03 b A	0.90 ± 0.1 a A	0.50 ± 0.1 b B	0.63 ± 0.04 a A	0.80 ± 0.1 a A	0.90 ± 0.3 a A	0.30 ± 0.1 a A	0.21 ± 0.04 a B	0.40 ± 0.1 a B

Рис. 7 — Состав жирных кислот (% от общего количества МЭЖК) в листьях *S. lycopersicum* (сорта MoneyMaker (ММ) и Micro-Tom (МТ)) и *S. lycopersicoides* в контрольных условиях, после 48 часов холодового воздействия и через 96 часов с начала эксперимента (48 часов восстановления). Нулевое значение указывает на отсутствие данного класса жирных кислот в образце. Данные представлены как средние значения ± стандартное отклонение для трёх биологических повторностей. Разные строчные буквы обозначают статистически значимые различия между временными точками в пределах одного вида; заглавные буквы обозначают статистически значимые различия между видами в одинаковые моменты времени ($p < 0,05$; однофакторный дисперсионный анализ с последующим критерием Тьюки). Цветовая шкала: зеленым цветом обозначено наименьшее значение, белым — среднее, красным — наибольшее значение

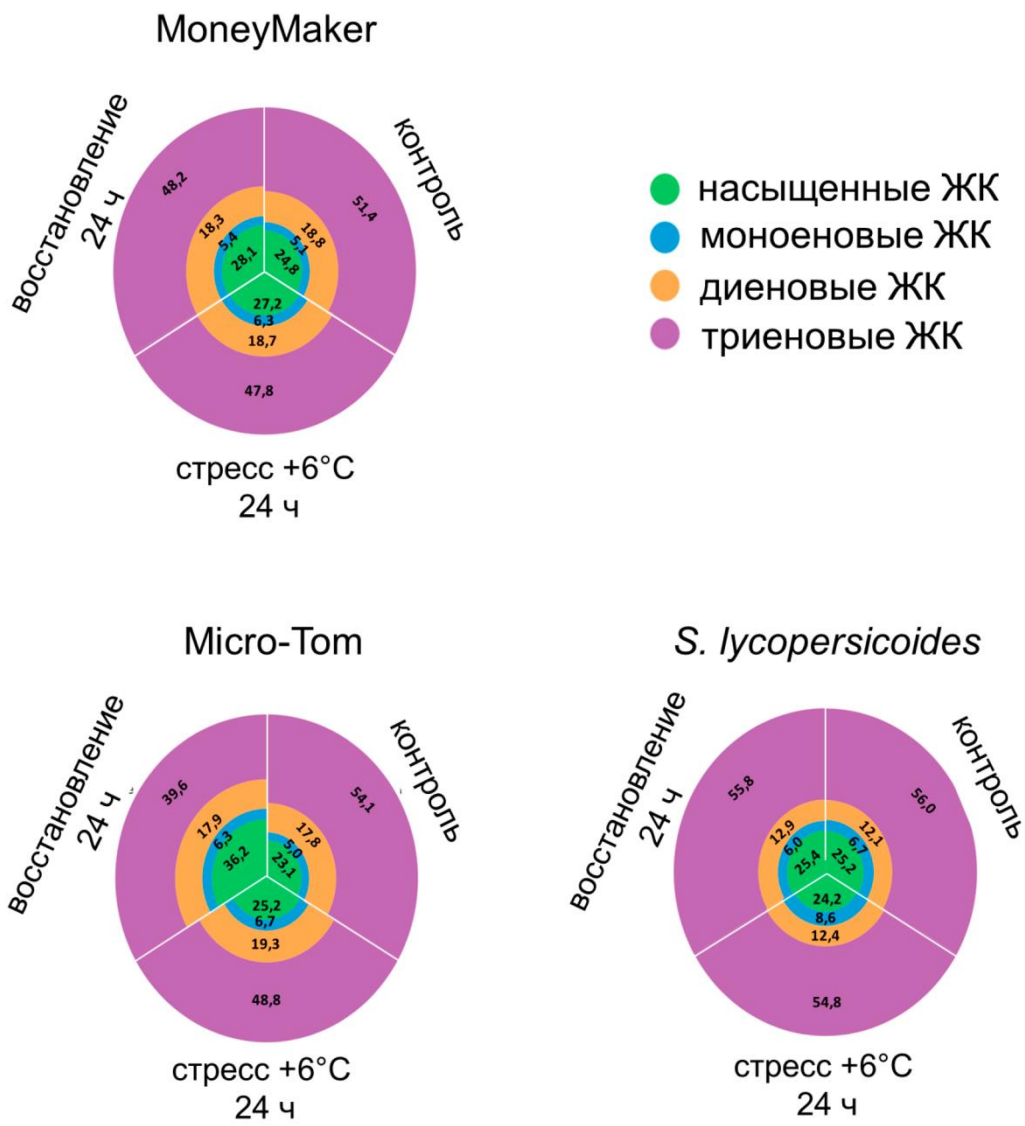

Рис. 8 — Представленность насыщенных, моноеновых, диеновых и триеновых жирных кислот у трех образцов томата в ходе холодового эксперимента и последующего восстановления

По результатам проведенного ЖК-анализа, который показывает изменения содержания ЖК в клетке в процессе воздействия стресса и в период восстановления, можно сделать следующие выводы (рис. 7 и 8). Наибольшую представленность в контрольных условиях имеют следующие ЖК:

для сорта MoneyMaker - 9,12,15-18:3 (44%), 16:0 (21%), 9,12-18:2 (18%), 7,10,13-16:3 (7,1%), 18:0 (2%), 9-18:1 (2%);

для сорта Micro-Tom - 9,12,15-18:3 (45%), 16:0 (17,7%), 9,12-18:2 (17,2%), 7,10,13-16:3 (8,2%), 7-16:1 (2,2%);

для *S. lycopersicoides* - 9,12,15-18:3 (51,3%), 16:0 (19,3%), 9,12-18:2 (11,7%), 7,10,13-16:3 (4,6%), 9-18:1 (3,6%);

В целом закономерности очень схожи и наибольшей представленностью обладают 18:3 и 16:0 ЖК, которые являются основными компонентами тилакоидных мембран и внешней мембраны хлоропласта. По динамике изменения содержания различных ЖК в период холодового стресса основные различия касаются сорта Micro-Tom по сравнению с двумя другими образцами, которые в целом демонстрируют схожие профили изменения. Так, для сорта Micro-Tom характерно увеличение содержания 16:0 и 18:0 и снижение триеновых ЖК 7,10,13-16:3 и 9,12,15-18:3 в ходе эксперимента (рис. 7 и 8). Интересны также изменения в содержании некоторых ЖК у Micro-Tom, в результате которых данный сорт становится похожим по этим параметрам на *S. lycopersicoides*. Так, содержание 7,10,13-16:3 у *S. lycopersicoides* ниже, чем у обоих сортов *S. lycopersicum*. После воздействия холода содержание данной ЖК у Micro-Tom падает, тогда как у MoneyMaker не изменяется. Таким образом, наблюдаемая динамика изменений у Micro-Tom направлена на достижение содержания, свойственного растениям *S. lycopersicoides*. Такой же эффект наблюдается для ЖК 18:0, содержание которой растет при холодовом воздействии, стремясь от базового уровня, одинакового для обоих сортов *S. lycopersicum*, к уровню, свойственному *S. lycopersicoides*. При этом ни у *S. lycopersicoides*, ни у MoneyMaker изменений содержания не происходит. Сходная ситуация показана для 9-18:1, но здесь уже повышается содержание и у *S. lycopersicoides* и у Micro-Tom, при том, что контрольный уровень у *S. lycopersicoides* выше, но содержание у MicroTom за период холодового стресса достигает этих показателей. Содержание данной ЖК у MoneyMaker не меняется. Таким образом, три ЖК 7,10,13-16:3, 18:0, 9-18:1 демонстрируют сходное содержание у Micro-Tom и *S. lycopersicoides* (Milovskaya et al., 2025).

6. Оценка степени обогащения мембранной фракции плазмалеммой методом определения активности маркерных ферментов.

Контроль эффективности мембранного фракционирования и степени обогащённости полученной плазмалемной фракции проводили на основании анализа распределения ферментативных маркеров, специфичных для различных мембранных компартментов клетки. В качестве маркера плазматической мембраны использовали ортованадат-чувствительную H^+-АТФазу Р-типа, тогда как для оценки возможной контаминации микросомальной фракцией определяли активность H^+-АТФазы V-типа (фермент тонопласта). Для анализа брали три фракции: фракцию микросом (содержащую смесь мембран: ПМ и эндомембраны), фракцию ПМ и фракцию эндомембран. Результаты

измерения активностей представлены в табл. 2. Данные полученные при анализе качества разделения мембран *S. lycopersicum* и *S. lycopersicoides* не различались. В данной таблице представлены результаты для *S. lycopersicoides*.

Таблица 2 — Активности маркерных ферментов во фракции микросомальных мембран, фракции ПМ и фракции эндомембран, полученных при фракционировании мембран листьев *S. lycopersicoides*.

pH	Фракция	Удельная активность, мкмоль/(мин*мг)			Падение активности, %	Обогащение относительно микросомальной фракции
		Нет ингибитора	Ортованадата натрия	KNO_3		
6,5 (оптимум работы H^+-АТФазы P-типа)	Микросомы	0,24 ± 0,01	0,22 ± 0,01	не ингибировали	6 ± 0,7	1,0
	Плазмалемма	0,19 ± 0,01	0,10 ± 0,01		50 ± 6,2	6,9 ± 0,01
	Эндомембраны	0,30 ± 0,02	0,29 ± 0,02		3 ± 0,4	0,6 ± 0,01
7,8 (оптимум работы H^+-АТФаы V-типа)	Микросомы	0,26 ± 0,01	не ингибировали	0,16 ± 0,02	38 ± 4,8	1,0
	Плазмалемма	0,13 ± 0,01		0,12 ± 0,01	3 ± 0,4	0,1 ± 0,02
	Эндомембраны	0,31 ± 0,01		0,20 ± 0,01	34 ± 4,4	1,1 ± 0,1

По реузльтатам, представленным в табл. 2, видно, что фракция «Плазмалемма» обогащена плазмалеммной H^+-АТФазой P-типа (самая высокая доля ортованадат-чувствительной активности 50%), фракция «Эндомембраны» содержит незначительную примесь плазмалеммы (ингибитор снижает активность на 3%). Фракция «Микросомы» ожидаемо представляет собой смесь плазмалеммы и эндомембран, но плазмалеммного маркера там меньше, чем тонопластного. Исходя из данных ортованадат-чувствительной активности (активность в отсутствие ортованадата за вычетом активности в присутствии ортованадата), «плазмалеммная» фракция оказывается обогащенной ПМ в 6,9 раз по сравнению с «микросомной».

Фракция эндомембран характеризовалась значительным ингибированием KNO_3 (≈ 34%), свидетельствующим о наличии активности H^+-АТФазы V-типа, характерной для тонопласта. Микросомальная фракция, как ожидалось, показала смешанный характер с высокой долей KNO_3-чувствительной активности и низкой ортованадат-чувствительной активностью.

Сравнительный анализ распределения маркерных активностей между исходной микросомальной фракцией и фракцией, полученной после разделения в двухфазной

системе ПЭГ–декстран, выявил выраженное перераспределение активности H^+-АТФазы P-типа в сторону плазмалемной фракции. Одновременно отмечалось снижение относительной активности ферментов, ассоциированных с мембранами тонопласта и другими внутриклеточными структурами, что свидетельствует о существенном уменьшении примеси эндомембранных компонентов. Полученные данные указывают на селективное обогащение плазматической мембраны в верхней фазе двухфазной системы и подтверждают эффективность использованной схемы фракционирования. Соотношение активностей маркерных ферментов между фракциями позволяет заключить, что полученная плазмалемная фракция характеризуется высокой степенью очистки и пригодна для проведения последующего биохимического и функционального анализа мембран.

7. Анализ жирнокислотного состава фракционированных органелл листьев у контрастных к холоду MoneyMaker и *S. lycopersicoides* в контрольных условиях.

Анализ ЖК-состава фракционированных органелл листьев у контрастных к холодовому стрессу MoneyMaker и *S. lycopersicoides* имел целью выявить базовые различия ЖК-профилей разных органелл в контрольных условиях. Для данного анализа был взят сорт MoneyMaker, показавший себя в вышеописанных экспериментах как наиболее контрастный по сравнению с перуанским *S. lycopersicoides*. 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, АГ). Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 — 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 3

	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 табл. 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). Назовем наблюдаемую разницу в ЖК-составе мембран разных фракций MoneyMaker «типизацией мембран», что будет отражать разницу в их составе в зависимости от функций. 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. Тогда как у *S. lycopersicoides* количество этих ЖК высоко во всех трех типах мембран. Учитывая особую регуляторную роль, которая показана для этих кислот в составе тилакоидных мембран, а также учитывая взаимосвязь 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 холодоустойчивости (Milovskaya et al., 2026).

Обратимся теперь к детальному сравнению ЖК-состава цитоплазматических мембран, по результатам которого зафиксированы отличия, представленные на рис. 9 (также см. таблицу 3 столбцы 3 и 7).

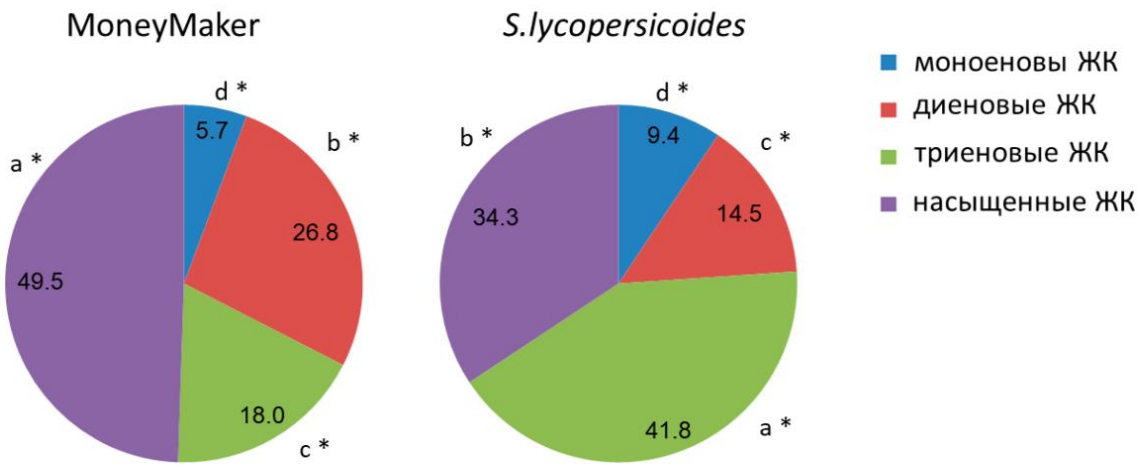

Рис. 9 — Состав насыщенных и ненасыщенных (моноеновых, диеновых и триеновых) жирных кислот (% от общего количества ЖК) в плазматической мембране листьев MoneyMaker и *S. lycopersicoides* в контрольных условиях. Показатели представлены как средние значения не менее чем от трех биологических повторностей. Разные строчные буквы обозначают значимые различия в содержании различных типов ЖК в пределах одного вида; звездочки (*) обозначают значимые межвидовые различия для одного и того же типа ЖК ($p < 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим тестом Тьюки)

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 (табл. 3). Среди ненасыщенных ЖК различия выявлены 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. Иными словами, одинаковое содержание демонстрируют только 14:0, 14-16:1, 18:0, 24:0 ЖК. Важно отметить, что *S. lycopersicoides* превосходит *S. lycopersicum* в содержании моноеновых и триеновых кислот, но уступает по содержанию насыщенных и диеновых. Это отражается в более высоких показателях индекса ненасыщенности (ИН) для *S. lycopersicoides.* Важно также, что в плазматической мембране *S. lycopersicoides* наибольшее содержание показано для 9,12,15-18:3 ЖК (почти 38%), тогда как у тепличного преобладает 16:0 ЖК (также почти 38%) (Milovskaya et al., 2026).

8. Сравнительное исследование текучести мембран двух видов томата с помощью электронного парамагнитного резонанса.

Для исследования физических свойств мембран мы воспользовались методом спиновых зондов. В качестве липидорастворимого зонда, чувствительного к изменениям свойств его молекулярного окружения, был выбран 5-доксил-стеарат (5-ДС, рис. 10А). Эта метка имеет парамагнитную группу >N-O• 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.

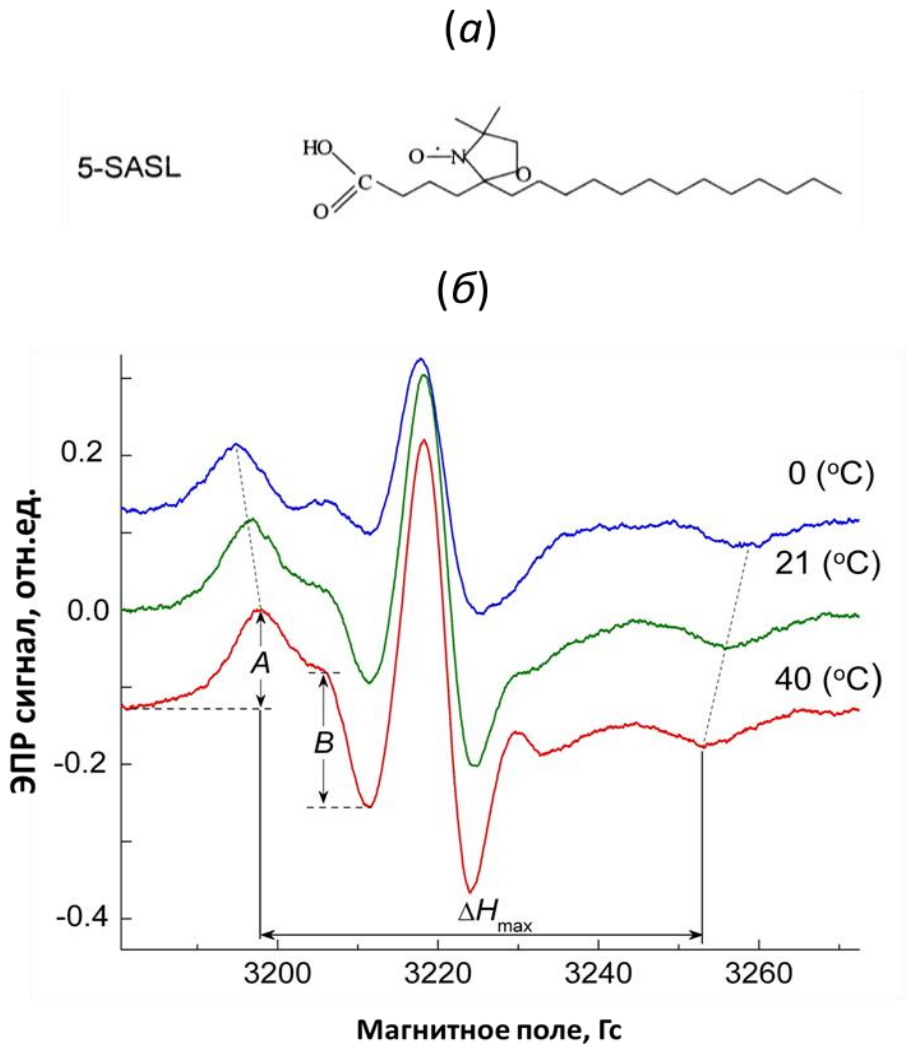

Рис. 10 — (А) – молекула 5-доксил-стеарата, липидорастворимого зонда, используемого при проведении ЭПР, (Б) – влияние температуры на спектр ЭПР зонда (5-доксил стеарат), встроенного в плазматическую мембрану томата *S. lycopersicoides*. С понижением температуры текучесть ПМ снижается (вязкость увеличивается), это результирует в снижении подвижности метки и увеличении параметра $\Delta H_{макс.}$

На рис. 10Б. показаны спектры ЭПР зонда 5-ДС, встроенного в плазматическую мембрану холодолюбивого вида томатов *S. lycopersicoides*, 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. Параметр спектра $\Delta H_{макс}$ уменьшается с ростом температуры. При этом также изменяется форма линии в низкополевой области спектра ЭПР, линия «А» сдвигается к центру спектра, амплитуда линии «В» увеличивается с ростом температуры. Все эти изменения однозначно свидетельствуют об увеличении подвижности и «хаотизации» ориентированности парамагнитного фрагмента с ростом температуры. В предельном случае, при быстром изотропном вращении парамагнитного фрагмента, компоненты «А» и «В» сливаются в одну линию. Заметим, что особенности формы спектра ЭПР зонда при низких температурах не позволяют рассчитать значения параметра упорядоченности *S*, используемого иногда для количественного описания подвижности и упорядоченности вращения парамагнитного фрагмента. По этой причине в качестве спектрального параметра, характеризующего изменения подвижности парамагнитного фрагмента при варьировании температуры, мы использовали спектральный параметр $\Delta H_{макс}$. Параметр $\Delta H_{макс}$ уменьшается с ростом температуры, что отражает менее вязкое состоянием мембран, но он остается четко различимым во всем диапазоне исследуемых нами температур. Неоднократно показано, что параметр $\Delta H_{макс}$ может служить надежной адекватной характеристикой подвижности зонда в мембране. Чем больше этот параметр, то есть чем шире расстояние между пиками, тем жестче мембрана, и, наоборот, уменьшение расстояния между крайними пиками свидетельствует о большей текучести мембраны.

В нашей работе мы регистрировали спектры в процессе снижения температуры препаратов цитоплазматических мембран двух исследуемых видов. По результатам были получены зависимости $\Delta H_{макс}$ от температуры, приведенные на рис. 11.

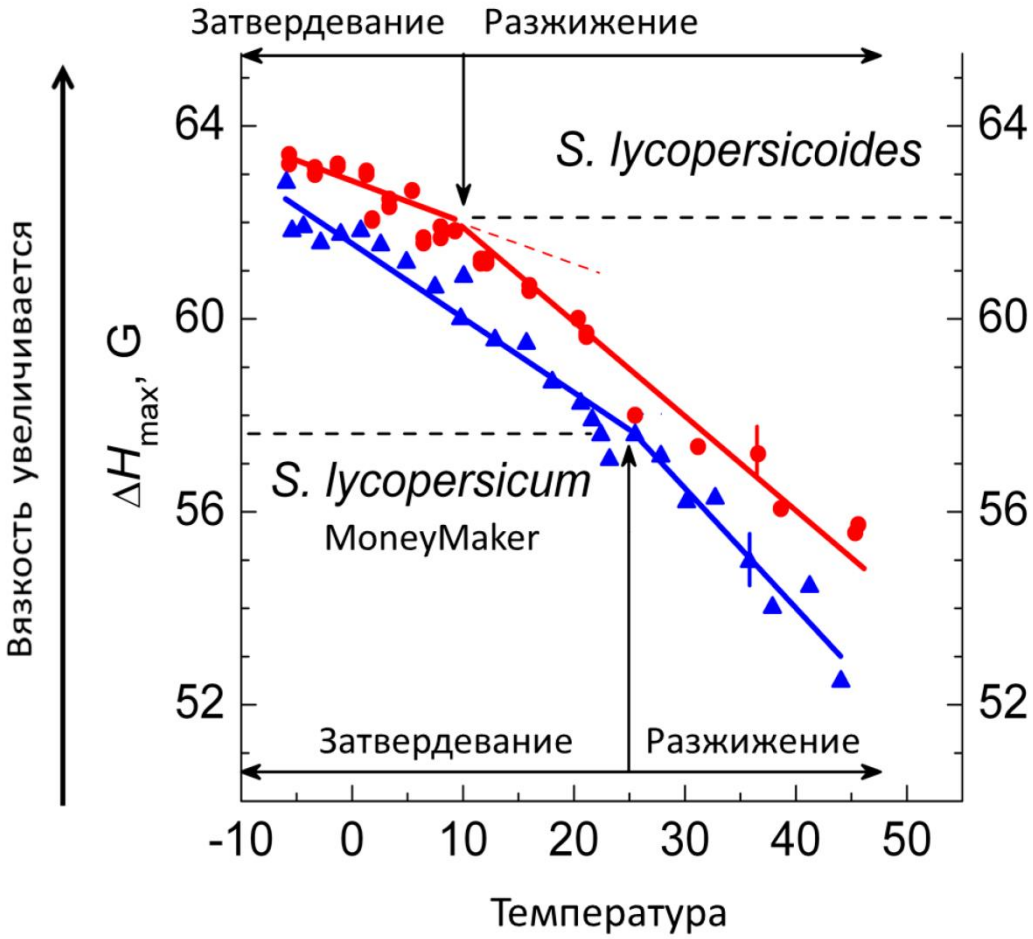

Рис. 11 — Температурные зависимости параметра $\Delta H_{макс}$, измеренные на плазматических мембранах теплолюбивого (*S. lycopersicum*) и холодоустойчивого (*S. lycopersicoides*) видов томатов

Полученные температурные зависимости параметра $\Delta H_{макс}$ заметно различаются. Для мембран холодоустойчивого вида мы всегда наблюдали более высокие значения параметр $\Delta H_{макс}$ по сравнению с контрольными мембранами (теплолюбивый вид). Это означает, что в мембранах холодоустойчивого вида подвижность зонда более низкая по сравнению с мембранами теплолюбивого. Таким образом, можно говорить, что мембрана перуанского томата *S. lycopersicoides* оказывается жестче мембраны тепличного вида при контрольных условиях роста. Это не согласуется с данными по ИН, который говорил о большей ненасыщенности мембраны перуанского томата.

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 соответственно.

Наиболее интересный для нас 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 °C). 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 °C) 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. 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 °C) для изменения $\Delta H_{макс}$ на 1 G необходимо приложить разницу в 14 °C, тогда как для тепличного томата в для изменения $\Delta H_{макс}$ на 1 G области температурной нормы (+25 °C) нужно всего лишь 6 °C (Milovskaya et al., 2026).

ОБСУЖДЕНИЕ

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 - +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 (содержание 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 холоду.

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.

1. Обсуждение результатов первой части работы.

1.1. Анализ снижения флуоресценции хлорофилла и степени утечки электролитов. Поддержание целостности клеточных мембран и мембран органелл является одним из ключевых механизмов холодоустойчивости и тесно связано с эффективностью антиоксидантной защиты клетки. Известно, что низкие температуры вызывают существенные изменения физико-химических свойств мембран, включая снижение текучести липидного бислоя и возможные фазовые переходы липидов, что приводит к функциональной дестабилизации мембранных белков и повышению проницаемости мембран (Sharom et al., 1994; Bergevin et al., 1993). Для холодочувствительных видов, в том числе томата, такие изменения рассматриваются как одна из первичных причин развития холодового повреждения, что согласуется с увеличением утечки электролитов, наблюдаемым при воздействии пониженных

температур и в постстрессовый период (Côté et al., 1993). Наряду с прямым физическим воздействием низких положительных температур, существенную роль в повреждении мембран играет окислительный стресс. При низкой температуре нарушается согласованность фотосинтетических и дыхательных процессов, что особенно выражено в условиях освещения. Замедление темновых реакций фотосинтеза при сохранении активности световых стадий приводит к перенасыщению электрон-транспортной цепи и усиленному образованию АФК в хлоропластах (Theocharis et al., 2012; Baker, 2008). АФК, в свою очередь, инициируют перекисное окисление липидов и окислительную модификацию мембранных белков, что усугубляет потерю барьерной функции мембран и приводит к нарушению ионного гомеостаза клетки (Demidchik, 2014). В этом контексте способность клеток к эффективной нейтрализации АФК приобретает решающее значение для сохранения структурной и функциональной целостности мембран и органелл. Ферментативные антиоксидантные системы, включающие супероксиддисмутазу, каталазы и аскорбатпероксидазы, а также низкомолекулярные антиоксиданты (аскорбат, глутатион, токоферолы, каротиноиды), ограничивают накопление АФК и предотвращают развитие цепных реакций липидной пероксидации (Hasanuzzaman et al., 2020). При недостаточной активности этих систем повреждение мембран приобретает прогрессирующий характер, формируя цикл, при котором дестабилизация мембран органелл усиливает метаболический дисбаланс и дальнейшее образование АФК. Наблюдаемое при холодовом стрессе увеличение утечки электролитов отражает степень нарушения целостности мембран и рассматривается как интегральный показатель мембранной стабильности (Demidchik, 2014). Одновременно функциональное состояние фотосинтетического аппарата, в частности фотосистемы II, чувствительно реагирует на холод-индуцированный окислительный стресс. Снижение эффективного квантового выхода ФС II (Y(II)) указывает на перераспределение поглощённой световой энергии в пользу нефотохимических путей диссипации и снижение доли энергии, используемой в фотохимических реакциях (Baker, 2008). Для томата показано, что изменения Y(II) тесно связаны с развитием нарушений, вызванных холодовым стрессом, и могут рассматриваться как функциональные маркеры стрессового состояния фотосинтетического аппарата (Yang et al., 2022). Таким образом, поддержание целостности мембран и органелл в условиях холодового стресса представляет собой комплексную задачу, требующую одновременной структурной адаптации мембран и эффективного контроля редокс-гомеостаза.

Из полученных данных по анализу эффективности работы ФС II (рис. 4Б) видно, что отклонения в работе фотосинтетического аппарата имеются у всех трех изучаемых типов

томатов, однако у *S. lycopersicoides* выражены в значительно меньшей степени – у данного вида даже через двое суток стресса эффективный квантовый выход ФС II выше по сравнению с данным показателем для сортов *S. lycopersicum*. Данные результаты дополняются результатами анализа утечки электролитов (рис. 4А), который показал для вида *S. lycopersicum* 4-х кратное увеличение степени утечки электролитов на вторые сутки стрессового воздействия для сорта MoneyMaker, 2-х кратное для сорта Micro-Tom, тогда как для *S. lycopersicoides* ни на одном из этапов холодового воздействия отклонений значений от показаний контроля не наблюдалось. Таким образом, двумя независимыми методами (рис. 4) продемонстрирована холодоустойчивость к низким положительным температурам у вида *S. lycopersicoides* по сравнению с *S. lycopersicum*. При сравнении двух сортов *S. lycopersicum* большую устойчивость демонстрирует Micro-Tom (Milovskaya et al., 2025).

1.2. Анализ содержания уровня транскриптов маркерных генов холодового ответа. Для анализа устойчивости исследуемых генотипов к холодовому стрессу было проведено комплексное исследование, сочетающее физиологические, биохимические и молекулярные характеристики исследуемых растений. В качестве молекулярных маркеров использовались показатели уровней транскриптов ТФ CBF. Активация CBF-зависимого сигнального пути рассматривается как один из ключевых молекулярных механизмов восприятия и передачи сигнала холодового стресса у высших растений. У томата, несмотря на общую холодочувствительность, данный путь функционально сохранён, что позволяет использовать гены семейства *CBF* в качестве ранних молекулярных маркеров холодового воздействия (Zhang et al., 2004). Повышение уровня транскриптов *CBF* при понижении температуры отражает факт активации холодового сигнального пути ICE–CBF–*COR* и может рассматриваться как индикатор включения адаптационных программ на транскрипционном уровне. Показано, что экспрессия *CBF*-генов у томата индуцируется уже в первые часы после начала холодового воздействия, что делает их особенно информативными для ранней диагностики стрессового ответа (Zhang et al., 2004; Carvallo et al., 2011). При этом характер и амплитуда индукции *CBF* зависят от органа, стадии развития и генотипа растения. Так, в листьях томата экспрессия *CBF1*, как правило, возрастает быстрее и достигает более высоких значений по сравнению с плодами, что указывает на органоспецифичность холодового ответа и требует строгой стандартизации объекта при использовании *CBF* в качестве маркеров (Weiss et al., 2009). В нашей работе использовались показатели уровней транскриптов в листьях исследуемых генотипов. Подход на основе ПЦР-РВ позволяет не только подтвердить факт воздействия

низкотемпературного стресса, но и оценить скорость запуска защитной реакции. Однако важно учитывать, что повышение уровня транскриптов *CBF* отражает прежде всего активацию сигнального механизма, а не обязательно степень конечной холодоустойчивости. Ряд исследований показал, что у томата индукция *CBF* не всегда сопровождается пропорциональным повышением устойчивости тканей к повреждению, что отличает его от модельных холодоустойчивых видов, таких как *A. thaliana* (Zhang et al., 2004; Weiss et al., 2009). В связи с этим *CBF*-гены целесообразно рассматривать не как самостоятельные маркеры устойчивости, а как маркеры активации холодового сигнального пути, использование которых наиболее эффективно в составе комплексной палитры показателей. При таком подходе экспрессия *CBF* обычно сопоставляется с транскрипционным ответом нижестоящих генов (*COR*-генов), а также с физиологическими и биохимическими параметрами холодового повреждения (Li et al., 2019). Подобный интегративный подход позволяет связать ранний сигнальный ответ с реализацией защитных механизмов и фактическим функциональным состоянием клеток. Также важную роль играет размер CBF-регулона у конкретного генотипа и механизмы транспорта белков (Knight et al., 2009). Таким образом, использование *CBF*-генов в качестве маркеров холодового стресса у томата является методически обоснованным и информативным подходом для оценки ранних этапов стрессового ответа. В то же время корректная интерпретация данных требует учёта органоспецифичности, временной динамики и обязательного сопоставления с другими генами и физиологическими показателями.

Если рассматривать временные профили изменения уровней транскриптов изучаемых генов *CBF* для каждого вида в отдельности (рис. 5 и 6), то можно увидеть, что повышение уровня транскриптов происходило на самых ранних стадиях эксперимента (в течение первого часа); затем, по ходу эксперимента, уровни транскриптов снижались и постепенно достигали контрольных значений. Быстрое увеличение уровней транскриптов объясняется регуляцией с помощью факторов транскрипции ICE, которые конститутивно присутствуют в ядре, но их активность зависит от типа посттрансляционной модификации (Guo et al., 2018, Miura et al., 2008). Ряд исследований показал, что экспрессия генов *CBF* инициируется примерно через 15 минут после начала воздействия холода (Gilmour et al., 1998) и быстро достигает максимума (Novillo et al., 2012). Подавление экспрессии регулируется длинной некодирующей РНК SVALKA. К моменту достижения пика экспрессия данной РНК в антисмысловом направлении *CBF1* увеличивается, что является механизмом, который прерывает экспрессию в смысловом направлении (Kindgren et al., 2018). Таким образом, наши данные об уровнях транскриптов *CBF* в течение первого дня

воздействия холодового стресса (рис. 5 и 6) согласуются с имеющимися в литературе. Хотя здесь стоит отметить разницу в достижении временного пика, при котором наблюдается наибольший уровень транскриптов: 20 мин для MoneyMaker и 2 часа и 1 час для Micro-Tom и *S. lycopersicoides* соответственно (рис. 5 и 6). Примечательно также, что для сорта Micro-Tom и вида *S. lycopersicoides* наблюдается повышение уровней транскриптов *CBF* в период восстановления, тогда как для сорта MoneyMaker это не показано. Сообщается, что для процесса деакклиматизации, когда после стресса возвращаются к норме физиологические процессы, бывает характерно повышение экспрессии *CBF* (Noriega et al., 2024). Показано, что *CBF* играют регуляторную роль в отношении не только *COR*-генов, но и ряда генов гормонального сигналинга, что важно для возобновления ростовых процессов (Song et al., 2021). Возможно, наблюдаемое повышение уровней транскриптов *CBF* в период восстановления является следствием процессов деакклиматизации у Micro-Tom и *S. lycopersicoides*.

Изучение уровней транскриптов *CBF* выявило различия в амплитуде данного показателя между разными видами, у MoneyMaker наблюдался резкий, но кратковременный пик повышения уровня транскриптов *CBF1* через 20 минут (рис. 5А), что согласуется с его ролью в качестве “гена восприимчивости” (Zhang et al., 2004). У Micro-Tom и *S. lycopersicoides* повышение уровня транскриптов *CBF1* было менее выраженным (рис. 6А) по сравнению с MoneyMaker, но все же имеется серьёзное превышение уровня транскрипта для сорта Micro-Tom при сравнении с перуанским видом. Для *S. lycopersicoides* стресс сопровождался значительным увеличением уровня транскриптов *CBF3* (рис. 5В, 6В), что характерно для резистентных генотипов (Mboup et al., 2012).

Период восстановления после стресса демонстрирует свои особенности, по которым можно дифференцировать исследуемые генотипы. В то время как у генотипа MoneyMaker наблюдалась быстрая деактивация защитных механизмов на фоне сохраняющихся физиологических повреждений, у более холодоустойчивых генотипов (Micro-Tom, *S. lycopersicoides*) поддерживались высокий уровень транскриптов генов *CBF* в период восстановления (рис. 5, 6). В целом следует отметить, что интерпретация результатов, касающихся анализа уровней транскриптов генов семейства *CBF*, остаётся затруднительной вследствие наличия многочисленных и нередко противоречивых литературных данных, а также отсутствия единого представления о специфических функциях отдельных членов данного семейства. В ряде исследований показано, что различные гены *CBF* демонстрируют неодинаковые профили экспрессии у различных видов томата в условиях холодового стресса (Zhang et al., 2004). Более того, различия в

экспрессии выявляются даже между холодоустойчивыми и холодочувствительными популяциями в пределах одного вида (Park et al., 2018).

Значительный вклад в понимание эволюции семейства *CBF* у диких томатов внесло исследование Mboup и соавт. (Mboup et al., 2012), выполненное на видах *S. peruvianum* и *S. chilense*, обитающих в экологических условиях, сходных с условиями произрастания *S. lycopersicoides*, использованного в настоящей работе. Авторы показали, что ген *CBF3* находится под действием сильного очищающего отбора. Несмотря на разнородность экспериментальных данных, для диких видов томата прослеживается чёткая закономерность: холодоустойчивые генотипы характеризуются более высоким уровнем как конститутивной, так и холод-индуцированной экспрессии *CBF3* по сравнению с холодочувствительными. В частности, Mboup и соавт. установили, что у *S. chilense* при воздействии холода (+4 °C) в менее устойчивой популяции Quicacha индуцировались все три гена семейства *CBF*, тогда как у устойчивой популяции Tacna наблюдалась сильная и избирательная индукция исключительно *CBF3* (Mboup et al., 2012). Примечательно, что не только индуцированный, но и базовый уровень экспрессии *CBF3* был выше у холодоустойчивых образцов. Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными в настоящем исследовании при сравнении уровней транскриптов генов *CBF* у холодоустойчивых и холодочувствительных видов томата, где более устойчивый генотип также характеризовался повышенным уровнем транскриптов *CBF3*. В противоположность этому, наивысшая экспрессия *CBF1* характерна для холодочувствительных тепличных томатов, что показано в ряде работ (Zhang et al., 2004). При этом нокаут гена *CBF1* у таких растений приводит к усилению чувствительности к холодовому воздействию (Novillo et al., 2004), что подчёркивает его важную, но функционально сложную роль в регуляции ответа на холодовой стресс.

Чтобы правильно трактовать полученные результаты, надо сказать несколько слов об известных на данный момент функциях *CBF*. Как уже было отмечено, сведения о характере экспрессии отдельных *CBF*-генов в условиях низкотемпературного стресса отличаются высокой вариабельностью и зачастую не образуют единой концептуальной картины. В частности, для томата описаны случаи, когда холодовое воздействие сопровождается избирательным повышением транскрипционной активности *CBF1*, без заметных изменений в уровнях экспрессии *CBF2* и *CBF3* (Zhang et al., 2004). Вместе с тем имеются сообщения, указывающие на координированную индукцию всех трёх представителей семейства *CBF* в ответ на понижение температуры (Zhang et al., 2020). Подобные расхождения, вероятно, отражают влияние как генетической специфики исследуемых объектов, так и различий в экспериментальных условиях.

Неоднозначность трактовки наблюдаемых экспрессионных профилей *CBF*-генов проявляется не только на межвидовом, но и на внутривидовом уровнях. Так, исследования на *A. thaliana* показали, что экотипы с контрастной холодоустойчивостью могут различаться по функциональному состоянию отдельных *CBF*-генов (Park et al., 2018). Эти данные указывают на комплексный характер регуляции холодового ответа и позволяют предположить различия в первичном восприятии температурного сигнала и его интеграции в регуляторные сети у устойчивых и чувствительных генотипов.

Дополнительные сложности при анализе функций *CBF*-генов связаны с вопросом их функциональной специализации. В ряде работ показано, что *CBF1, CBF2* и *CBF3* обладают значительным перекрытием по спектру регулируемых генов и способны выполнять сходные регуляторные функции (Gilmour et al., 2004). Однако имеются данные, указывающие на наличие в данном семействе генов с различными регуляторными функциями. Показано, что *CBF2* способен ограничивать уровень экспрессии генов *CBF1* и *CBF3* в условиях холодового воздействия. (Novillo et al., 2004; Novillo et al., 2007). Согласно этим данным, экспрессия *CBF1 и CBF3* активируется на ранних этапах стресса, тогда как включение *CBF2* происходит позднее и может выполнять функцию отрицательной обратной связи. Подтверждением такой модели служит повышенная холодоустойчивость растений *A. thaliana* с нарушенной функцией *CBF2* (Novillo et al., 2004). При этом полноценная реализация холодового ответа требует согласованного действия *CBF1* и *CBF3*, поскольку дефекты одного из этих факторов приводят к ослаблению устойчивости к низким температурам (Novillo et al., 2007).

Несмотря на многообразие описанных вариантов, для диких горных видов томата прослеживается устойчивая тенденция: холодоустойчивые генотипы характеризуются повышенным уровнем как базальной, так и индуцированной холодом экспрессии *CBF3* по сравнению с чувствительными формами (Mboup et al., 2012). Данная закономерность позволяет рассматривать *CBF3* в качестве одного из ключевых молекулярных индикаторов холодовой адаптации у диких представителей рода *Solanum*.

Исходя из вышеизложенного, роль разных генов *CBF* у томата можно обобщить следующим образом:

1. Ген *CBF1* – самый чувствительный к холодовому стрессу представитель семейства *CBF*.
2. Ген *CBF2* – возможный негативный регулятор *CBF1*, однако имеются эксперименты, демонстрирующие его синергичную с *CBF1* функцию.
3. Ген *CBF3* – наиболее сильно экспрессируемый у холодостойких видов.

Возвращаясь к нашим результатам, важно отметить, что мы наблюдаем 300-кратное увеличение уровней транскриптов *CBF1* гена у тепличного томата *S. lycopersicum* по сравнению с данным показателем для перуанского *S. lycopersicoides* (рис.5А и 6А), а для гена *CBF3* (рис. 5В и 6В), наоборот, динамика противоположная: уровень транскрипта *CBF3* выше у перуанского вида. Поскольку экспрессия этих генов свойственна одного теплолюбивым растениям, а другого, напротив, холодоустойчивым растениям, можно использовать показатель увеличения уровней их транскриптов как один из маркеров для определения типа ответа на стресс. По нашим результатам, можно говорить, что результаты ПЦР-РВ согласуются с результатами анализов утечки электролитов (рис. 4А) и эффективности работы ФС II (рис. 4Б) – перуанский вид *S. lycopersicoides* подтверждает свой холодоустойчивый фенотип, тогда как тепличный *S. lycopersicum* показывает чувствительность к холоду, исходя из результатов анализа уровня транскриптов (Milovskaya et al., 2025).

1.3. Анализ динамики изменений суммарного содержания жирных кислот в условиях холодового воздействия. Устойчивость мембран к холодовому воздействию является критически важным условием выживания растительных клеток. ЖК-состав мембранных липидов рассматривается как один из основных факторов, определяющих их физическое состояние, поэтому на данном этапе работы анализ изменения тотального содержания ЖК во временной динамике воздействия холода был выбран, как один из характеристических показателей ответа на стресс. Следует отметить, что роль ЖК-состава не ограничивается лишь поддержанием физического состояния мембран. Современные исследования указывают на участие мембранных липидов в процессах клеточной сигнализации (Laxalt et al., 2025; Huby et al., 2020; Ali et al., 2018). Изменения текучести мембран могут влиять на активность мембранных рецепторов и ионных каналов, инициируя сигнальные реакции, направленных на активацию экспрессии защитных генов (Hugly, Somerville, 1992). В этом контексте ЖК и их производные рассматриваются как элементы регуляторных систем, участвующих в формировании стрессового ответа.

В нашей работе мы проводили два типа исследования ЖК-состава растений. В первой части работы сравнивали тотальный состав ЖК листьев трех исследуемых генотипов в динамике ответа на холод (рис. 7, 8). Данное исследование не позволяет проанализировать особенности состава именно ПМ клеток, но даёт возможность оценить комплексный биохимический ответ растения на стресс. Анализ тотального содержания ЖК в динамике холода у трех генотипов показал, что в контрольных условиях у всех исследованных образцов доминируют α-линоленовая (9,12,15-18:3) и пальмитиновая

(16:0) жирные кислоты (рис. 7), являющиеся основными компонентами мембран хлоропластов. В целом жирнокислотные профили сходны, однако в условиях холодового стресса выявлены различия во временной динамике их содержания. Наиболее выраженные изменения характерны для сорта Micro-Tom: отмечается увеличение содержания насыщенных жирных кислот (16:0 и 18:0) и снижение триеновых (7,10,13-16:3 и 9,12,15-18:3), что приводит к уменьшению индекса ненасыщенности (рис. 7, 8). Для ряда жирных кислот (7,10,13-16:3, 18:0 и 9-18:1) в условиях холодового стресса формируется сходство между сортом Micro-Tom и видом *S. lycopersicoides*. У MoneyMaker и *S. lycopersicoides* существенных изменений по ходу стресса не наблюдается (рис. 7).

У всех трех изучаемых типов томатов 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%) (рис. 7). 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). О важной роли ненасыщенных ЖК для восстановления ФС II после фотоингибирования при низких температурах сообщалось в ряде работ (Alfonso et al., 2021; Zhu et al., 2007). Вероятно, повышенное содержание 9,12,15-18:3 может являться одной из причин устойчивости *S. lycopersicoides* к низким температурам (Milovskaya et al., 2025).

2. Заключение по первой части работы. В первой части нашей 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 уровней транскриптов) мы экспериментально подтвердили устойчивость перуанского *S. lycopersicoides* к холодовому стрессу (рис. 4, 5, 6,). Напротив, оба сорта вида *S. lycopersicum* демонстрировали

чувствительность к низким температурам, однако отличались друг от друга по степени восприимчивости стресса. Физиологические характеристики сорта Micro-Tom показывали большую стабильность при воздействии низких положительных температур по сравнению с таковыми для сорта MoneyMaker. При анализе уровней транскриптов наблюдалось некоторое сходство молекулярных ответов между сортом Micro-Tom и видом *S. lycopersicoides:* время от начала холодового воздействия, соответствующее максимальному уровню транскриптов *CBF,* составляло 1-2 часа после начала воздействия, наличие значительного уровня транскриптов *CBF* в период восстановления (рис. 5, 6). 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 (рис. 7, 8). Обобщение физиологических, молекулярных и биохимических характеристик трех изучаемых томатов в условиях холодового стресса представлено в таблице 4 (Milovskaya et al., 2025).

Таблица 4 ─ 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

	Тип томата		
Тип эксперимента	MoneyMaker	Micro-Tom	*S. lycopersicoides*
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 снижается: 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%

Окончание таблицы 4

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

3. Обсуждение результатов второй части работы.

3.1. Анализ жирнокислотного состава плазматических мембран и других мембранных органелл контрастных видов в контрольных условиях. Результаты ЖК-анализа, проведенные на фракционированных образцах мембран, позволяют сделать сравнения двух типов – сравнить состав ПМ двух видов между собой (таблица 3, рис. 9), а также сравнить между собой состав разных мембранных органелл внутри одного вида (таблица 3). При сравнении ПМ показано достаточно большое различие в их составе между видами. Мембрана перуанского *S. lycopersicoides* была обогащена моноеновыми и триеновыми кислотами по сравнению мембраной тепличного *S. lycopersicum*, но уступала

по содержанию насыщенных и диеновых (рис. 9). Все это результирует в более высоких показателях ИН для *S. lycopersicoides*. Отсюда можно было бы предположить бóльшую текучесть мембран перуанского вида по сравнению с тепличным в контрольных условиях (+25 °C), однако как показывают результаты ЭПР, при этой температуре мембрана тепличного вида оказывается более текучей (на рис. 11 значение $\Delta H_{макс}$ при +25 °C у тепличного меньше). Это противоречие может быть объяснено разницей состава белков, а также содержанием стеринов в мембране.

Наибольший интерес в этой части исследования для нас представляют результаты сравнения состава разных мембранных 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 α-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 (табл. 3). Тогда как у *S. lycopersicoides* количество 9,12,15-18:3 ЖК высоко во всех трех типах мембран (табл. 3). Данная ЖК имеет высокую ненасыщенность, и, поэтому играет главенствующую роль в разжижении мембран при понижении температуры, предотвращая их затвердевание. К тому же она 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 α-линоленовая кислота является предшественником жасмоновой кислоты, которая способна активировать гены *CBF* (Sharma et al., 2016). Сообщается, что репрессорный белок JAZ инактивирует положительный регулятор ответа на холод – белок ICE. При наличии жасмоната JAZ подвергается протеасомной деградации, в результате чего снимается инактивация с ICE и он выполняет свою стимулирующую функцию в отношении *CBF*. Таким образом, α-линоленовая кислота выполняет структурную функцию, поддерживая текучесть за счет высокой ненасыщенности, а также является субстратом для синтеза сигнальной молекулы жасмоната, потенциирующей 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 составляющих его повышенной холодоустойчивости (Milovskaya et al., 2026).

3.2. Анализ текучести плазматических мембран контрастных по холодоустойчивости видов при постепенном снижении температуры. В сериях описанных выше экспериментов получены убедительные доказательства того, что перуанский *S. lycopersicoides* более резистентен в отношении холода, чем тепличный *S. lycopersicum*. Следующей и самой главной задачей данной работы было сравнить показатели текучести мембран контрастных видов в динамике ответа на понижение температуры. Необходимо 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. Выбранный метод ЭПР спиновых зондов уже не раз показывал свою состоятельность и зарекомендовал себя как надежный способ измерить вязкость мембран. Метод ЭПР позволяет регистрировать изменения динамического состояния липидного бислоя на молекулярном уровне и является высокочувствительным инструментом анализа тонких перестроек мембранной структуры (Berliner, 1976; Marsh, 1981). В основе метода лежит взаимодействие неспаренных электронов стабильных нитроксильных радикалов с внешним магнитным полем. Используемые спиновые зонды и метки чувствительны к локальной подвижности молекул, что позволяет оценивать микровязкость мембран, отражающую их латеральную гетерогенность (Hubbell, McConnell, 1971; Marsh et al., 1989). Параметры ЭПР-спектра, включая ширину линий, соотношение интенсивностей экстремумов и корреляционное время вращения, напрямую связаны с динамикой липидов и изменяются при увеличении вязкости мембранной среды (Freed, 1976). Высокая чувствительность ЭПР обеспечивает регистрацию незначительных изменений физического состояния мембран, в том числе фазовых переходов липидного бислоя, сопровождающихся резким ростом вязкости (McConnell, 1976). Это особенно важно при анализе температурных эффектов и стрессовых воздействий в физиологии растений. Метод применим в широком диапазоне экспериментальных условий и не требует разрушения мембранной структуры, что позволяет использовать его для изолированных мембран, клеточных фракций и интактных клеток (Schreier et al., 1978). По сравнению с флуоресцентными методами и ядерным магнитным резонансом, ЭПР не зависит фотодеструкции зондов, обладает высокой воспроизводимостью и меньшей зависимостью от оптических свойств образца, что особенно важно при длительных

измерениях (Marsh, 2008). В контексте стрессовой физиологии растений метод ЭПР широко применяется для оценки адаптационных перестроек мембран и служит связующим звеном между их биохимическим составом и физическим состоянием (Yeagle, 1993). Эти особенности делают метод незаменимым инструментом в фундаментальных исследованиях мембран и в прикладных работах, направленных на изучение механизмов адаптации к стрессовым факторам. Так, в работах Тихонова с соавт. сравнивались температурные зависимости параметра $\Delta H_{макс}$ для молекул зонда, встроенных в тилакоидные мембраны двух видов рода *Cucumis* — *C. sativus*, *C. melo*. Авторы выращивали растения при температуре +25 °C, а затем сравнивали, как изменяется текучесть тилакоидных мембран в зависимости от температуры (Lyutova et al., 1988). На полученных ими зависимостях были обнаружены изломы. Температура, при которой они наблюдались, четко соответствовала оптимальной температуре роста этих видов. Главными же нашими результатами в этой работе являются, во-первых, наличие изломов на прямых зависимостей $\Delta H_{макс}$ от температуры (рис. 11) и, во-вторых, разные скорости изменения вязкости при понижении температуры (рис. 11). В данном случае первый наш результат аналогичен результатам Тихонова с соавт. – на кривых зависимостей текучести цитоплазматической мембраны от температуры изломы наблюдаются при тех значениях, при которых растение растет в естественных условиях. Это позволяет нам думать, что проведенная работа и результаты заслуживают доверия. Второй результат является основным и показывает, что мембрана перуанского томата *S. lycopersicoides* действительно при определённой пороговой разнице температур (относительно естественного оптимума) способна поддерживать оптимальную текучесть. И эта пороговая разница больше у перуанского *S. lycopersicoides*, чем у тепличного вида *S. lycopersicum*, мембрана которого резко изменяет свою вязкость при относительно небольшом понижении температуры. Иными словами, можно говорить, что «буферная емкость» параметра текучести ПМ у перуанского вида больше, чем у теплолюбивого. Для теплолюбивого томата при отклонении значений от оптимальной температуры 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 (Milovskaya et al., 2026).

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 (ΔH_{max}) 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 *S. lycopersicoides* способна сохранять оптимальную текучесть в определённом диапазоне температур относительно природного оптимума. При этом данный диапазон у *S. lycopersicoides* шире, чем у тепличного томата *S. lycopersicum*, мембрана которого резко изменяет вязкость уже при незначительном понижении температуры. Иначе говоря, «буферная ёмкость» параметра текучести плазматической мембраны у холодоустойчивого вида выше, чем у теплолюбивого. На вопрос, поставленный в начале исследования, можно ответить следующим 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 иметь 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лось Д. А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот // Успехи биологической химии. 2001. Т. 41. С. 163-198.
2. Романов Г., Ракитин В., Лось Д., Лысенко Е., Пожидаева Е., Беляев Д., Садовская В. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. Moscow: LitRes, 2019.
3. Трунова Т.И. Растения и низкотемпературный стресс. М.: Наука, 2007. 52 с.
4. Adhikari L. Cold stress in plants: Strategies to improve cold tolerance in forage species // Plant Stress. 2022. V. 4. P. 100081. https://doi.org/10.1016/j.stress.2022.100081
5. Alexandersson E., Saalbach G., Larsson C., Kjellbom P. Arabidopsis plasma membrane proteomics identifies components of transport, signal transduction and membrane trafficking // Plant Cell Physiol. 2004. V. 45. No. 11. P. 1543–1556. https://doi.org/10.1093/pcp/pch173
6. Alfonso M., Luján M.A., Picorel R. Role of Lipids and Fatty Acids in the Maintenance of Photosynthesis and the Assembly of Photosynthetic Complexes During Photosystem II Turnover // Photosynthesis: Molecular Approaches to Solar Energy Conversion / Eds. Shen J.R., Satoh K., Xu C. Cham: Springer, 2021. P. 395-427. https://doi.org/10.1007/978-3-030-67407-6_15
7. Ali U., Li H., Wang X., Guo L. Emerging roles of sphingolipid signaling in plant response to biotic and abiotic stresses // Mol. Plant. 2018. V. 11. No. 11. P. 1328–1343. https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.10.001
8. Angmo D., Phukon K., Angmo S., Tamchos S., Namgial D., Stobdan T., Chaurasia O.P. Effect of cold stress on field performance, chlorophyll fluorescence, electrolyte leakage and leaf gas exchange parameters of potato (Solanum tuberosum L.) genotypes // Potato Research. 2023. V. 66. P. 641-661. https://doi.org/10.1007/s11540-022-09589-2
9. Annunziata M.G., Ciarmiello L.F., Woodrow P., Dell'Aversana E., Carillo P. Spatial and temporal profile of glycine betaine accumulation in plants under abiotic stresses // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. P. 230. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00230
10. Armstrong A.F., Badger M.R., Day D.A., Barthet M.M., Smith P.M.C., Millar A.H., Whelan J., Atkin O.K. Dynamic changes in the mitochondrial electron transport chain underpinning cold acclimation of leaf respiration // Plant Cell Environ. 2008. V. 31. P. 1156-1169. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01830.x
11. Artus N.N., Uemura M., Steponkus P.L., Gilmour S.J., Lin C., Thomashow M.F. Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* COR15a gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1996. V. 93. No. 23. P. 13404–13409. https://doi.org/10.1073/pnas.93.23.13404

12. Baker N.R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo // Annu. Rev. Plant Biol. 2008. V. 59. P. 89-113. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759
13. Ban Q., Wang X., Pan C., Wang Y., Kong L., Jiang H., Jiang Y., Liu G., Cheng Y. Comparative analysis of the response and gene regulation in cold resistant and susceptible tea plants // PLoS One. 2017. V. 12(12). Art. e0188514. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188514
14. Baumann K. Membrane-to-nucleus signals modulate plant cold tolerance // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2017. V. 18. P. 277. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.38
15. Bergevin M., Lachaîne L., Willemot C. Effect of chilling and subsequent storage at 20°C on electrolyte leakage and phospholipid fatty acid composition of tomato pericarp // Physiol. Plant. 1993. V. 88. P. 619-625. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1993.tb01380.x
16. Berliner L.J., ed. Spin Labeling: Theory and Applications. New York: Academic Press, 1976. 592 p.
17. Bishop G.J., Nomura T., Yokota T., Harrison K., Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Jones J.D.G., Kamiya Y. The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 1761-1766. https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1761
18. Campos M.L., Carvalho R.F., Benedito V.A., Peres L.E.P. Small and remarkable: The Micro-Tom model system as a tool to discover novel hormonal functions and interactions // Plant Signal. Behav. 2010. V. 5. P. 267-270. https://doi.org/10.4161/psb.5.3.10624
19. Carvallo M.A., Pino M.T., Jeknić Z., Zou C., Doherty C.J., Shiu S.H., Chen T.H.H., Thomashow M.F. A comparison of the low temperature transcriptomes and CBF regulons of three plant species that differ in freezing tolerance: Solanum commersonii, Solanum tuberosum, and Arabidopsis thaliana // J. Exp. Bot. 2011. V. 62. P. 3807-3819. https://doi.org/10.1093/jxb/err066
20. Chen M., Thelen J.J. ACYL-LIPID DESATURASE2 is required for chilling and freezing tolerance in Arabidopsis // Plant Cell. 2013. V. 25. P. 1430-1444. https://doi.org/10.1105/tpc.113.111179
21. Christie J.M., Blackwood L., Petersen J., Sullivan S. Plant flavoprotein photoreceptors // Plant Cell Physiol. 2015. V. 56. P. 401-413. https://doi.org/10.1093/pcp/pcu196
22. Côté F., Levasseur A., Bélanger R.R., Tremblay F.M. Limitation to the use of electrolyte leakage for the determination of chilling injury in tomato fruit // Postharvest Biol. Technol. 1993. V. 2. P. 287-292. https://doi.org/10.1016/0925-5214(93)90039-5
23. Demidchik V. Mechanisms and physiological roles of K^+ efflux from root cells // J. Plant Physiol. 2014. V. 171. P. 696-707. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.01.005
24. Demidchik V., Straltsova D., Medvedev S.S., Pozhvanov G.A., Sokolik A., Yurin V. Stress-induced electrolyte leakage: the role of K+-permeable channels and involvement in programmed

cell death and metabolic adjustment // J. Exp. Bot. 2014. V. 65. P. 1259-1270. https://doi.org/10.1093/jxb/eru004

25. Ding F., Liu B., Zhang S. Exogenous melatonin ameliorates cold-induced damage in tomato plants // Sci. Hortic. 2017. V. 219. P. 264-273. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.03.023
26. Ding Y., Shi Y., Yang S. Molecular regulation of plant responses to environmental temperatures // Mol. Plant. 2020. V. 13. P. 544-564. https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.02.004
27. Doherty C.J., Van Buskirk H.A., Myers S.J., Thomashow M.F. Roles for Arabidopsis CAMTA Transcription Factors in Cold-Regulated Gene Expression and Freezing Tolerance // Plant Cell. 2009. V. 21. P. 972-984. https://doi.org/10.1105/tpc.108.063958
28. Dominguez T., Hernandez L.M., Pennycooke J.C., Jimenez P., Martínez-Rivas J.M., Sanz C., Stockinger E.J., Sanchez-Serrano J.J., Sanmartin M. Increasing ω-3 desaturase expression in tomato results in altered aroma profile and enhanced resistance to cold stress // Plant Physiol. 2010. V. 153. P. 655-665. https://doi.org/10.1104/pp.110.154815
29. Ensminger I., Busch F., Hüner N.P.A. Photostasis and cold acclimation: sensing low temperature through photosynthesis // Physiol. Plant. 2006. V. 126. P. 28-44. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00627.x
30. Eremina M., Rozhon W., Poppenberger B. Hormonal control of cold stress responses in plants // Cell. Mol. Life Sci. 2016. V. 73. P. 797-810. https://doi.org/10.1007/s00018-015-2089-6
31. Eriksson S., Kutzer M., Procek J., Gröbner G., Harryson P. Tunable Membrane Binding of the Intrinsically Disordered Dehydrin Lti30, a Cold-Induced Plant Stress Protein // Plant Cell. 2011. V. 23. P. 2391-2404. https://doi.org/10.1105/tpc.111.085183
32. Fowler S., Thomashow M.F. Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway // Plant Cell. 2002. V. 14. No. 8. P. 1675–1690. https://doi.org/10.1105/tpc.003483
33. Franklin K., Whitelam G. Light-quality regulation of freezing tolerance in Arabidopsis thaliana // Nat. Genet. 2007. V. 39. P. 1410-1413. https://doi.org/10.1038/ng.2007.3
34. Freed J.H. Theory of slow tumbling ESR spectra for nitroxides // J. Chem. Phys. 1976. V. 64. P. 349-366. https://doi.org/10.1063/1.432450
35. Fujii S., Wada H., Kobayashi K. Role of galactolipids in plastid differentiation before and after light exposure // Plants. 2019. V. 8. Art. 357. https://doi.org/10.3390/plants8100357
36. Fujii Y., Hasegawa S., Kodama Y. The cold-induced switch in the direction of chloroplast relocation depends on the lifetime of the phototropin photoactivated state // PLoS ONE. 2020. V. 15. Art. e0233302. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233302
37. Fujii Y., Tanaka H., Konno N., Ogasawara Y., Hamashima N., Tamura S., Hasegawa S., Hayashi M., Okajima K., Kodama Y., Wada M. Phototropin perceives temperature based on the

lifetime of its photoactivated state // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. V. 114. P. 9206-9211. https://doi.org/10.1073/pnas.1704462114

38. Genkel’ P.A., Kushnirenko S.V. Kholodostoikost’ rastenii i termicheskie sposoby ee povysheniya (Plant Cold Tolerance and Thermal Methods to Increase It). Moscow: Nauka, 1966. 236 p.
39. Gilmour S.J., Fowler S.G., Thomashow M.F. Arabidopsis transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities // Plant Mol. Biol. 2004. V. 54. P. 767-781. https://doi.org/10.1023/B:PLAN.0000040902.06881.d4
40. Gilmour S.J., Zarka D.G., Stockinger E.J., Salazar M.P., Houghton J.M., Thomashow M.F. Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression // Plant J. 1998. V. 16. P. 433-442. https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00310.x
41. Gomès E., Jakobsen M.K., Axelsen K.B., Geisler M., Palmgren M.G. Chilling tolerance in Arabidopsis involves ALA1, a member of a new family of putative aminophospholipid translocases // Plant Cell. 2000. V. 12. P. 2441-2454. https://doi.org/10.1105/tpc.12.12.2441
42. Guo X., Liu D., Chong K. Cold signaling in plants: Insights into mechanisms and regulation // J. Integr. Plant Biol. 2018. V. 60. P. 745-756. https://doi.org/10.1111/jipb.12706
43. Gupta R., Deswal R. Antifreeze proteins enable plants to survive in freezing conditions // J. Biosci. 2014. V. 39. P. 931-944. https://doi.org/10.1007/s12038-014-9468-2
44. Han N., Fan S., Zhang T. SlHY5 is a necessary regulator of the cold acclimation response in tomato // Plant Growth Regul. 2020. V. 91. P. 1-12. https://doi.org/10.1007/s10725-020-00583-7
45. Hart J.E., Sullivan S., Hermanowicz P., Díaz-Ramos L.A., Hoey D.A., Jones A.R., Huala E., Christie J.M. Engineering the phototropin photocycle improves photoreceptor performance and plant biomass production // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2019. V. 116. P. 12550-12557. https://doi.org/10.1073/pnas.1902915116
46. Hasanuzzaman M., Bhuyan M.H.M.B., Zulfiqar F., Raza A., Mohsin S.M., Mahmud J.A., Fujita M., Fotopoulos V. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator // Antioxidants. 2020. V. 9. Art. 681. https://doi.org/10.3390/antiox9080681
47. He M., Qin C.-X., Wang X., Ding N.-Z. Plant Unsaturated Fatty Acids: Biosynthesis and Regulation // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. Art. 390. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00390
48. Hofmann T.A., Atkinson W., Fan M., Simkin A.J., Jindal P., Lawson T. Impact of climate-driven changes in temperature on stomatal anatomy and physiology // Philos. Trans. R. Soc. B. 2025. V. 380. Art. 20240244. https://doi.org/10.1098/rstb.2024.0244

49. Hölzl G., Dörmann P. Chloroplast lipids and their biosynthesis // Annu. Rev. Plant Biol. 2019. V. 70. P. 51-81. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100202
50. Hsiao S.I., Lee C.M., Doherty C.J., Gilmour S.J., Kim Y., Thomashow M.F. Regulation of the Arabidopsis CBF regulon by a complex low-temperature regulatory network // Plant J. 2015. V. 82. P. 193-207. https://doi.org/10.1111/tpj.12813
51. Hubbell W.L., McConnell H.M. Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes // J. Am. Chem. Soc. 1971. V. 93. P. 314-326. https://doi.org/10.1021/ja00731a005
52. Huby E., Napier J.A., Baillieul F., Michaelson L.V., Dhondt-Cordelier S. Sphingolipids: towards an integrated view of metabolism during the plant stress response // New Phytol. 2020. V. 227. No. 5. P. 1259–1273. https://doi.org/10.1111/nph.15997
53. Hugly S., Somerville C. A role for membrane lipid polyunsaturation in chloroplast biogenesis at low temperature // Plant Physiol. 1992. V. 99. P. 197-202. https://doi.org/10.1104/pp.99.1.197
54. Huner N.P., Öquist G., Sarhan F. Energy balance and acclimation to light and cold // Trends Plant Sci. 1998. V. 3. P. 224-230. https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01248-5
55. Huo C., Zhang B., Wang R. Research progress on plant noncoding RNAs in response to low-temperature stress // Plant Signal. Behav. 2022. V. 17. Art. 2004035. https://doi.org/10.1080/15592324.2021.2004035
56. Inoue S., Kinoshita T., Matsumoto M., Nakayama K.I., Doi M., Shimazaki K. Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. P. 5626-5631. https://doi.org/10.1073/pnas.0709189105
57. Iqbal Z., Iqbal M.S., Singh S.P., Buaboocha T. Ca2+/calmodulin complex triggers CAMTA transcriptional machinery under stress in plants: signalling cascade and molecular regulation // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. Art. 598327. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.598327
58. Ishishita K., Tsukaya H., Takagi S. Phototropin2 contributes to the chloroplast avoidance response at the chloroplast–plasma membrane interface // Plant Physiol. 2020. V. 182. P. 863-875. https://doi.org/10.1104/pp.19.01079
59. Ivanova T.V., Voronkov A.S. Lighting Intensity Affects the Fatty Acid Composition of Total Lipids of Basil Leaves and Roots (Ocimum basilicum L.) // Russ. J. Plant Physiol. 2023. V. 70. Art. 94. https://doi.org/10.1134/S102144372260291X
60. Jan N., Andrabi K.I. Cold resistance in plants: A mystery unresolved // Electron. J. Biotechnol. 2009. V. 12. P. 14-15. https://doi.org/10.2225/vol12-issue5-fulltext-10
61. Jha U.C., Nayyar H., Roychowdhury R., Prasad P.V.V., Parida S.K., Siddique K.H.M. Non-coding RNAs (ncRNAs) in plants: Master regulators for adapting to extreme temperature conditions // Plant Physiol. Biochem. 2023. V. 202. Art. 108164. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.108164

62. Jimbo H., Wada H. Deacylation of galactolipids decomposes photosystem II dimers to enhance degradation of damaged D1 protein // Plant Physiol. 2023. V. 191. P. 87-95. https://doi.org/10.1093/plphys/kiac427
63. Joshi R., Singh B., Chinnusamy V. Genetically engineering cold stress-tolerant crops: approaches and challenges // Cold Tolerance in Plants: Physiological, Molecular and Genetic Perspectives / Eds. S. I. Allakhverdiev, V. D. Kreslavski, V. V. Kuznetsov, D. A. Los. Springer, 2018. P. 179-198. https://doi.org/10.1007/978-3-030-01415-5_10
64. Jost P., Libertini L.J., Hebert V.C., Griffith O.H. Lipid spin labels in lecithin multilayers: A study of motion along fatty acid chains // J. Mol. Biol. 1971. V. 59. P. 77-98. https://doi.org/10.1016/0022-2836(71)90414-1
65. Jung J.H., Domijan M., Klose C., Biswas S., Ezer D., Gao M., Khattak A.K., Box M.S., Charoensawan V., Cortijo S., Kumar M., Grant A., Locke J.C.W., Schäfer E., Jaeger K.E., Wigge P.A. Phytochromes function as thermosensors in Arabidopsis // Science. 2016. V. 354. P. 886-889. https://doi.org/10.1126/science.aaf6005
66. Kalaji H.M., Schansker G., Ladle R.J., Goltsev V., Bosa K., Allakhverdiev S.I. et al. Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues // Photosynth. Res. 2014. V. 122. P. 121-158. https://doi.org/10.1007/s11120-014-0024-6
67. Kanesaki Y., Suzuki I., Allakhverdiev S.I., Mikami K., Murata N. Salt stress and hyperosmotic stress regulate the expression of different sets of genes in Synechocystis sp. PCC 6803 // Plant Physiol. 2002. V. 130. P. 597-605. https://doi.org/10.1104/pp.004499
68. Karabudak T., Bor M., Özdemir F., Türkan İ. Glycine betaine protects tomato (Solanum lycopersicum) plants at low temperature by inducing fatty acid desaturase7 and lipoxygenase gene expression // Mol. Biol. Rep. 2014. V. 41. P. 1401-1410. https://doi.org/10.1007/s11033-013-2985-5
69. Kasahara M., Kagawa T., Oikawa K., Suetsugu N., Miyao M., Wada M. Chloroplast avoidance movement reduces photodamage in plants // Nature. 2002. V. 420. P. 829-832. https://doi.org/10.1038/nature01213
70. Keith A.D., Sharnoff M., Cohn G.E. A summary and evaluation of spin labels used as probes for biological membrane structure // Biochim. Biophys. Acta. 1973. V. 300. P. 379-419. https://doi.org/10.1016/0304-4157(73)90014-2
71. Kidokoro S., Yoneda K., Takasaki H., Takahashi F., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Different Cold-Signaling Pathways Function in the Responses to Rapid and Gradual Decreases in Temperature // Plant Cell. 2017. V. 29. P. 760-774. https://doi.org/10.1105/tpc.16.00669

72. Kim T., Kim S., Han T., Lee J., Chang S. ABA and polyamines act independently in primary leaves of cold-stressed tomato (Lycopersicon esculentum) // Physiol. Plant. 2002. V. 115. P. 370-376. https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1150305.x
73. Kindgren P., Ard R., Ivanov M., Marquardt S. Transcriptional read-through of the long non-coding RNA SVALKA governs plant cold acclimation // Nat. Commun. 2018. V. 9. Art. 4561. https://doi.org/10.1038/s41467-018-07010-6
74. Knapp S., Peralta I.E. The Tomato (*Solanum lycopersicum* L., Solanaceae) and its botanical relatives // In: Causse M., Giovannoni J., Bouzayen M., Zouine M. (eds) The Tomato Genome. Compendium of Plant Genomes. Berlin, Heidelberg: Springer, 2016. P. 1–24. https://doi.org/10.1007/978-3-662-53389-5_2
75. Knight H., Trewavas A.J., Knight M.R. Cold calcium signaling in Arabidopsis involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation // Plant Cell. 1996. V. 8. P. 489-503. https://doi.org/10.1105/tpc.8.3.489
76. Knight M.R. Signal transduction leading to low-temperature tolerance in Arabidopsis thaliana // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 2002. V. 357. P. 871-876. https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1096
77. Knight M.R., Campbell A.K., Smith S.M., Trewavas A.J. Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium // Nature. 1991. V. 352. P. 524-526. https://doi.org/10.1038/352524a0
78. Knight H., Mugford S.G., Ulker B., Gao D., Thorlby G., Knight M.R. Identification of SFR6, a key component in cold acclimation in *Arabidopsis thaliana* // Plant J. 2009. V. 58. P. 630–641. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03763.x
79. Kodama Y., Tsuboi H., Kagawa T., Wada M. Low-temperature-induced chloroplast relocation mediated by phototropin 2 in fern gametophytes // J. Plant Res. 2008. V. 121. P. 441-448. https://doi.org/10.1007/s10265-008-0165-9
80. Komatsu A., Terai M., Ishizaki K., Suetsugu N., Tsuboi H., Nishihama R., Yamato K.T., Wada M., Kohchi T. Phototropin encoded by a single-copy gene mediates chloroplast photorelocation movements in the liverwort Marchantia polymorpha // Plant Physiol. 2014. V. 166. P. 411-427. https://doi.org/10.1104/pp.114.245100
81. Kosakivska I.V., Babenko L.M., Skaterna T.D., Ustinova A.Yu. Influence of hypo- and hyperthermia on lipoxygenase activity, content of pigments and soluble proteins in Triticum aestivum L. cv. Yatran 60 seedlings // Genet. Plant Physiol. 2014. V. 4. P. 212-220.
82. Kratsch H.A., Wise R.R. The ultrastructure of chilling stress // Plant Cell Environ. 2000. V. 23. P. 337-350. https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00560.x

83. Kuiper M.J., Davies P.L., Walker V.K. A theoretical model of a plant antifreeze protein from Lolium perenne // Biophys. J. 2001. V. 81. P. 3560-3565. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75986-3
84. Kumar S., Kiruba R., Balamurugan S., Cardoso H.G., Sathishkumar R. Carrot antifreeze protein enhances chilling tolerance in transgenic tomato // Acta Physiol. Plant. 2014. V. 36. P. 21-27. https://doi.org/10.1007/s11738-013-1383-x
85. Lapshin N.K., Piotrovskii M.S., Trofimova M.S. Involvement of plasma membrane H+-ATPase in diamide-induced extracellular alkalization by roots from pea seedlings // Planta. 2021. V. 253. Art. 10. https://doi.org/10.1007/s00425-020-03532-w
86. Larsson C., Sommarin M., Widell S. Isolation of highly purified plasma membranes and the separation of inside-out and right-side-out vesicles // Methods Enzymol. 1994. V. 228. P. 451-469. https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)28042-8
87. Laxalt A.M., van Hooren M., Munnik T. Plant PI-PLC signaling in stress and development // Plant Physiol. 2025. V. 197. No. 2. Art. kiae534. https://doi.org/10.1093/plphys/kiae534
88. Lazar D. Chlorophyll a fluorescence induction // Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Bioenerg. 1999. V. 1412. P. 1-28. https://doi.org/10.1016/S0005-2728(99)00047-X
89. Lee C.M., Thomashow M.F. Photoperiodic regulation of the C-repeat binding factor (CBF) cold acclimation pathway and freezing tolerance in Arabidopsis thaliana // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 15054-15059. https://doi.org/10.1073/pnas.1211295109
90. Lee S.H., Ahn S.J., Im Y.J., Cho K., Chung G.C., Cho B.-H., Han O. Differential impact of low temperature on fatty acid unsaturation and lipoxygenase activity in figleaf gourd and cucumber roots // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. V. 330. P. 1194-1198. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.098
91. Levitt J. Responses of Plants to Environmental Stress, Volume 1: Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses. Academic Press, 1980. 497 p.
92. Li N., Xu C., Li-Beisson Y., Philippar K. Fatty Acid and Lipid Transport in Plant Cells // Trends Plant Sci. 2016. V. 21. P. 145-158. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.10.011
93. Li Q., Zheng Q., Shen W., Cram D., Fowler D.B., Wei Y., Rajashekar C.B., Williams T.D., Wang X. Understanding the biochemical basis of temperature-induced lipid pathway adjustments in plants // Plant Cell. 2015. V. 27. P. 86-103. https://doi.org/10.1105/tpc.114.134338
94. Li X., Chen L., Forde B.G., Davies W.J. Overexpression of CBF genes affects cold tolerance and development in tomato // Plant Sci. 2018. V. 272. P. 225-234. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.04.016

95. Li J., Yang Y., Iqbal A., Qadri R., Shi P., Wang Y. Correlation analysis of cold-related gene expression with physiological and biochemical indicators under cold stress in oil palm // PLOS ONE. 2019. V. 14. Art. e0225768. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225768
96. Liang S.M., Kuang J.F., Ji S.J., Chen Q.F., Deng W., Min T., Shan W., Chen J.Y., Lu W.J. The membrane lipid metabolism in horticultural products suffering chilling injury // Food Qual. Saf. 2020. V. 4. P. 9-16. https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyaa001
97. Lindqvist Y., Huang W., Schneider G., Shanklin J. Crystal structure of Δ9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other di-iron proteins // EMBO J. 1996. V. 15. P. 4081-4092. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00782.x
98. Liu X., Teng Y., Li B. Enhancement of low-temperature tolerance in transgenic tomato plants overexpressing Lefad7 through regulation of trienoic fatty acids // Photosynthetica. 2013. V. 51. P. 238-244. https://doi.org/10.1007/s11099-013-0014-5
99. Liu Z., Jia Y., Ding Y., Shi Y., Li Z., Guo Y., Gong Z., Yang S. Plasma membrane CRPK1-mediated phosphorylation of 14-3-3 proteins induces their nuclear import to fine-tune CBF signaling during cold response // Mol. Cell. 2017. V. 66. P. 117-128.e5. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.016
100. Los D.A., Mironov K.S., Allakhverdiev S.I. Regulatory systems in cyanobacteria: stress responses and adaptation // FEMS Microbiol. Rev. 2010. V. 34. P. 642-657. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00218.x
101. Los D.A., Murata N. Regulation of Enzymatic Activity and Gene Expression by Membrane Fluidity // Sci. STKE. 2000. V. 2000. Art. pe1. https://doi.org/10.1126/stke.2000.62.pe1
102. Los D.A., Ray M.K., Murata N. Differences in the control of the temperature-dependent desaturation of membrane lipids in Synechocystis sp. and Synechococcus sp. // FEBS Lett. 1997. V. 400. P. 52-56. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01375-0
103. Lovdal T., Lillo C. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress // Anal. Biochem. 2009. V. 387. P. 238-242. https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.01.024
104. Lukatkin A.S., Brazaitytė A., Bobinas Č., Duchovskis P. Chilling injury in chilling-sensitive plants: A review // Žemdirbystė-Agriculture. 2012. V. 99. No. 2. P. 111–124.
105. Lyutova M.I., Tikhonov A.N. Comparison of the temperature dependence of lipid-soluble spin label mobility in thylakoid membranes of melon and cucumber chloroplasts // Biofizika (Rus.). 1988. V. 33. P. 460-464.
106. Ma X., Jin Q., Wang Y., Sun K., Wang X. Comparative transcriptome analysis reveals the regulatory mechanisms of two tropical water lilies in response to cold stress // BMC Genomics. 2023. V. 24. Art. 82. https://doi.org/10.1186/s12864-023-09176-w

107. Maleki M., Ghorbanpour M. Cold tolerance in plants: molecular machinery deciphered // Biochemical, Physiological and Molecular Avenues for Combating Abiotic Stress Tolerance in Plants / Eds. A. K. Srivastava, C. S. B. Singh, C. Gupta, C. Tiwari. Academic Press, 2018. P. 57-71.

108. Manishankar P., Kudla J. Cold tolerance encoded in one SNP // Cell. 2015. V. 160. P. 1045-1046. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.037

109. Marsh D. Electron spin resonance in membrane research: protein–lipid interactions // Methods. 2008. V. 46. P. 83-96. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2008.06.011

110. Marsh D. Electron spin resonance: spin labels // Membrane Spectroscopy. Berlin, Heidelberg: Springer, 1981. P. 51-142.

111. Marsh D. Spin-label studies of lipid membranes // Biochim. Biophys. Acta. 1989. V. 988. P. 239-262. https://doi.org/10.1016/0304-4157(89)90019-8

112. Martí E., Gisbert C., Bishop G.J., Dixon M.S., García-Martínez J.L. Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. P. 2037-2047. https://doi.org/10.1093/jxb/erj154

113. Martinière A., Lavagi I., Nageswaran G., Rolfe D.J., Maneta-Peyret L., Luu D.-T., Botchway S.W., Webb S.E.D., Mongrand S., Maurel C., Martin-Fernandez M.L., Kleine-Vehn J., Friml J., Moreau P., Runions J. Homeostasis of plasma membrane viscosity in fluctuating temperatures // New Phytol. 2012. V. 192. P. 328-337. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03821.x

114. Mboup M., Fischer I., Lainer H., Stephan W. Trans-species polymorphism and allele-specific expression in the CBF gene family of wild tomatoes // Mol. Biol. Evol. 2012. V. 29. P. 3641-3652. https://doi.org/10.1093/molbev/mss176

115. McConnell H.M. Molecular motion in biological membranes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1976. V. 73. P. 306-310. https://doi.org/10.1073/pnas.73.2.306

116. Mikami K., Kanesaki Y., Suzuki I., Murata N. The histidine kinase Hik33 mediates responses to multiple environmental stresses in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803 // Plant Cell Physiol. 2002. V. 43. P. 1342-1350. https://doi.org/10.1093/pcp/pcf162

117. Milovskaya I. Molecular mechanisms of plant responses to cold stress // Russian Journal of Plant Physiology. 2024. V. 71. Art. 200. https://doi.org/10.1134/S1021443724606086

118. Milovskaya I., Voronkov A., Ivanova T., Kuznetsov V., Pashkovskiy P. 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. 2025. V. 11. Art. 1342. https://doi.org/10.3390/horticulturae11111342

119. Milovskaya I., Trubitsin B., Voronkov A., Ivanova T., Piotrovskii M., Trofimova M., Kuznetsov V., Tikhonov A., Pashkovskiy P. 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. 2026. V. 230. Art. 110943. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2025.110943

120. Mitalo O.W., Tokiwa S., Kondo Y., Ushijima K., Nakano R., Inaba A., Kubo Y. Cold stress transcriptional networks in tomato fruit // Postharvest Biol. Technol. 2023. V. 195. Art. 112129. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.112129
121. Miura K., Hasegawa P.M. Regulation of cold signaling by sumoylation of ICE1 // Plant Signal. Behav. 2008. V. 3. P. 52-54. https://doi.org/10.4161/psb.3.1.4865
122. Mori K., Renhu N., Naito M., Nakamura A., Shiba H., Yamamoto T., Suzaki T., Iida H., Miura K. Ca2+-permeable mechanosensitive channels MCA1 and MCA2 mediate cold-induced cytosolic Ca2+ increase and cold tolerance in Arabidopsis // Sci. Rep. 2018. V. 8. Art. 550. https://doi.org/10.1038/s41598-017-17483-y
123. Murata N., Los D.A. Membrane fluidity and temperature perception // Plant Physiol. 1997. V. 115. P. 875-879. https://doi.org/10.1104/pp.115.3.875
124. Murata N., Takahashi S., Nishiyama Y., Allakhverdiev S.I. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress // Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Bioenerg. 2007. V. 1767. P. 414-421. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2006.11.019
125. Murata N., Wada H. Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria // Plant Cell Physiol. 1995. V. 36. P. 565-573. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078790
126. Nejadsadeghi L., Maali-Amiri R., Zeinali H., Ramezanpour S. Membrane fatty acid compositions and cold-induced responses in tetraploid and hexaploid wheats // Mol. Biol. Rep. 2015. V. 42. P. 363-372. https://doi.org/10.1007/s11033-014-3776-3
127. Noguchi M., Shimizu N., Asakura R., Hayashi T., Kodama Y. Phototropin 2 mediates daily cold priming to promote light responses in Arabidopsis // J. Exp. Bot. 2025. V. 76. P. 2309-2319. https://doi.org/10.1093/jxb/eraf040
128. Noriega X., Rubio S., Pérez F.J. Cold Acclimation and Deacclimation Processes in Grapevine Buds: Insights into the Regulation of Cod Hardiness and ICE-CBF-COR Gene Expression // J. Plant Growth Regul. 2024. [Online first]. https://doi.org/10.1007/s00344-024-11322-x
129. Nosenko T., Stephan W. Adaptation to low temperatures in the wild tomato species Solanum chilense // Mol. Ecol. 2016. V. 25. P. 2853-2867. https://doi.org/10.1111/mec.13649
130. Novillo F., Medina J., Rodríguez-Franco M., Neuhaus G., Salinas J. Genetic analysis reveals a complex regulatory network modulating CBF gene expression and Arabidopsis response to abiotic stress // J. Exp. Bot. 2012. V. 63. P. 293-304. https://doi.org/10.1093/jxb/err312

131. Novillo F., Medina J., Salinas J. Arabidopsis CBF1 and CBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation and define different gene classes in the CBF regulon // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2007. V. 104. No. 52. P. 21002–21007. https://doi.org/10.1073/pnas.0705639104

132. Novillo F., Medina J., Salinas J. CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in Arabidopsis // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2004. V. 101. No. 11. P. 3985–3990. https://doi.org/10.1073/pnas.0303029101

133. Orvar B.L., Sangwan V., Omann F., Dhindsa R.S. Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity // Plant J. 2000. V. 23. P. 785-794. https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00845.x

134. Palta J.P., Whitaker B.D., Weiss L.S. Plasma Membrane Lipids Associated with Genetic Variability in Freezing Tolerance and Cold Acclimation of Solanum Species // Plant Physiol. 1993. V. 103. P. 793-803. https://doi.org/10.1104/pp.103.3.793

135. Papageorgiou G.C., Murata N. The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving Photosystem II complex // Photosynth. Res. 1995. V. 44. P. 243-252. https://doi.org/10.1007/BF00048597

136. Park E., Jeknić Z., Pino M.-T., Murata N., Chen T.H.H. Glycinebetaine accumulation is more effective in chloroplasts than in the cytosol for protecting transgenic tomato plants against abiotic stress // Plant Cell Environ. 2007. V. 30. P. 994-1005. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01694.x

137. Park E., Jeknić Z., Sakamoto A., DeNoma J., Yuwansiri R., Murata N., Chen T.H.H. Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in tomato protects seeds, plants, and flowers from chilling damage // Plant J. 2004. V. 40. P. 474-487. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02237.x

138. Park S., Gilmour S.J., Grumet R., Thomashow M.F. CBF-dependent and CBF-independent regulatory pathways contribute to the differences in freezing tolerance and cold-regulated gene expression of two Arabidopsis ecotypes locally adapted to sites in Sweden and Italy // PLoS One. 2018. V. 13. No. 12. Art. e0207723. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207723

139. Park S., Lee C.M., Doherty C.J., Gilmour S.J., Kim Y., Thomashow M.F. Regulation of the Arabidopsis CBF regulon by a complex low-temperature regulatory network // Plant J. 2015. V. 82. No. 2. P. 193–207. https://doi.org/10.1111/tpj.12805

140. Pavangadkar K., Thomashow M.F., Triezenberg S.J. Histone dynamics and roles of histone acetyltransferases during cold-induced gene regulation in Arabidopsis // Plant Mol. Biol. 2010. V. 74. P. 183-200. https://doi.org/10.1007/s11103-010-9665-9

141. Pfannschmidt T., Nilsson A., Allen J.F. Photosynthetic control of chloroplast gene expression // Nature. 1999. V. 397. P. 625-628. https://doi.org/10.1038/17634

142. Plieth C. Temperature sensing by plants: Calcium-permeable channels as primary sensors - a model // J. Membr. Biol. 1999. V. 172. P. 121-127. https://doi.org/10.1007/s002329900590

143. Popov V.N., Antipina O.V., Trunova T.I. Lipid peroxidation during low-temperature adaptation of cold-sensitive tobacco leaves and roots // Russ. J. Plant Physiol. 2010. V. 57. P. 144-151. https://doi.org/10.1134/S1021443710010206

144. Reimer J.J., Thiele B., Biermann R.T., Junker-Frohn L.V., Wiese-Klinkenberg A., Usadel B., Wormit A. Tomato leaves under stress: A comparison of stress response to mild abiotic stress between a cultivated and a wild tomato species // Plant Mol. Biol. 2021. V. 107. P. 177-192. https://doi.org/10.1007/s11103-021-01195-z

145. Sangwan V., Orvar B.L., Beyerly J., Hirt H., Dhindsa R.S. Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways // Plant J. 2002. V. 31. P. 629-638. https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2002.01384.x

146. Schreier S., Polnaszek C.F., Smith I.C.P. Spin labels in membranes. Problems in practice // Biochim. Biophys. Acta. 1978. V. 515. No. 4. P. 395–436. https://doi.org/10.1016/0304-4157(78)90011-4

147. Seki M., Narusaka M., Abe H., Kasuga M., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Hayashizaki Y., Shinozaki K. Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray // Plant Cell. 2001. V. 13. No. 1. P. 61–72. https://doi.org/10.1105/tpc.13.1.61

148. Shah S.H., Ali S., Hussain Z., Qureshi M.K., Jan S.A. Chilling tolerance in three tomato transgenic lines overexpressing CBF3 gene controlled by a stress inducible promoter // Environ. Sci. Pollut. Res. 2017. V. 24. P. 18536-18545. https://doi.org/10.1007/s11356-017-9460-0

149. Sharma M., Laxmi A. Jasmonates: emerging players in controlling temperature stress tolerance // Front. Plant Sci. 2016. V. 6. Art. 1129. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01129

150. Sharom M., Willemot C., Thompson J.E. Chilling Injury Induces Lipid Phase Changes in Microsomal Membranes of Tomato Fruit // Plant Physiol. 1994. V. 104. P. 1033-1039. https://doi.org/10.1104/pp.104.3.1033

151. Shi Y., Ding Y., Yang S. Molecular Regulation of CBF Signaling in Cold Acclimation // Trends Plant Sci. 2018. V. 23. P. 623-637. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.04.002

152. Sinetova M.A., Los D.A., Lyukevich A.A., Zorina A.A., Kupriyanova E.V., Mironov K.S., Allakhverdiev S.I. Mechanisms of cold acclimation and stress response in cyanobacteria // Front. Microbiol. 2017. V. 8. Art. 1514. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01514

153. Smith I.C.P. A spin label study of the organization and fluidity of hydrated phospholipid multibilayers - a model membrane system // Chimia. 1971. V. 25. P. 349-349.

154. Smith J.E., Mengesha B., Tang H., et al. Resistance to *Botrytis cinerea* in *Solanum lycopersicoides* involves widespread transcriptional reprogramming // BMC Genomics. 2014. V. 15. Art. 334. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-334

155. Song Y. The direct targets of CBF: in cold stress response and beyond // J. Integr. Plant Biol. 2021. V. 63. P. 1874-1886. https://doi.org/10.1111/jipb.13161

156. Stirbet A., Govindjee. Chlorophyll a fluorescence induction: a personal perspective of the thermal phase, the J–I–P rise // Photosynth. Res. 2012. V. 113. P. 15-61. https://doi.org/10.1007/s11120-012-9754-5

157. Stirbet A., Govindjee. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient // J. Photochem. Photobiol. B. 2011. V. 104. P. 236-257. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.02.002

158. Sui N., Li M., Zhao S.J., Li F., Liang H., Meng Q.W. Overexpression of glycerol-3-phosphate acyltransferase gene improves chilling tolerance in tomato // Planta. 2007. V. 226. P. 1097-1108. https://doi.org/10.1007/s00425-007-0554-7

159. Suzuki I., Los D.A., Kanesaki Y., Mikami K., Murata N. The histidine kinase Hik33 is an important participant in cold-signal transduction in cyanobacteria // Plant Cell Physiol. 2000. V. 41. P. 15-23. https://doi.org/10.1093/pcp/41.1.15

160. Suzuki K., Nagasuga K., Okada M. The chilling injury induced by high root temperature in the leaves of rice seedlings // Plant Cell Physiol. 2008. V. 49. P. 433-442. https://doi.org/10.1093/pcp/pcn020

161. Thalhammer A., Hincha D.K. A mechanistic model of COR15 protein function in plant freezing tolerance: Integration of structural and functional characteristics // Plant Signal. Behav. 2014. V. 9. P. e977722. https://doi.org/10.4161/15592324.2014.977722

162. Theocharis A., Clément C., Barka E.A. Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures // J. Exp. Bot. 2012. V. 63. P. 186-199. https://doi.org/10.1093/jxb/err223

163. Thomashow M.F. Molecular basis of plant cold acclimation: insights gained from studying the CBF cold response pathway // Plant Physiol. 2010. V. 154. P. 571-577. https://doi.org/10.1104/pp.110.161794

164. Tikhonov A.N., Subczynski W.K. Application of spin labels to membrane bioenergetics: Photosynthetic systems of higher plants // Biomedical EPR, Part A: Free Radicals, Metals, Medicine, and Physiology / Eds. Eaton S.S., Eaton G.R., Berliner L.J. Springer US, 2005. P. 147-194. https://doi.org/10.1007/0-387-26741-7_8

165. Tóth S.Z., Schansker G., Strasser R.J. A non-invasive assay of the plastoquinone pool redox state based on the OJIP-transient // Photosynth. Res. 2007. V. 93. P. 193-203. https://doi.org/10.1007/s11120-007-9179-8

166. Tovuu A., Zulfugarov I.S., Lee C.H. Rice mutants deficient in ω-3 fatty acid desaturase (FAD8) fail to acclimate to cold temperatures // Plant Physiol. Biochem. 2016. V. 109. P. 525-534. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.10.018

167. Urrutia M.E., Duman J.G., Knight C.A. Plant thermal hysteresis proteins // Biochim. Biophys. Acta. 1992. V. 1121. P. 199–206. https://doi.org/10.1016/0167-4838(92)90355-H

168. Vogel J.T. The CBF cold response pathways of Arabidopsis and tomato // Cold Hardiness in Plants: Molecular Genetics, Cell Biology and Physiology / Eds. T. H. H. Chen, M. Uemura, S. Fujikawa. Wallingford: CABI Publishing, 2006. P. 11-29.

169. Vogel J.T., Zarka D.G., Van Buskirk H.A., Fowler S.G., Thomashow M.F. Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of Arabidopsis // Plant J. 2005. V. 41. P. 195-211. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02288.x

170. Wada H., Mizusawa N. Lipids in Photosynthesis // Advances in Photosynthesis and Respiration. Dordrecht: Springer, 2009. V. 30. P. 263-282. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2863-1_11

171. Wang C., Teng Y., Zhu S. NaCl- and cold-induced stress activate different Ca^{2+}-permeable channels in *Arabidopsis thaliana* // Plant Growth Regul. 2019. V. 87. P. 217–226. https://doi.org/10.1007/s10725-018-0464-7

172. Wang F., Yan J., Ahammed G.J., Wang X., Bu X., Xiang H., Li Y., Lu J., Liu Y., Qi H., Qi M., Li T. PGR5/PGRL1 and NDH mediate far-red photoprotection in response to chilling stress in tomato // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. Art. 669. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00669

173. Wang G., Guo Z. Effects of chilling stress on photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence parameter in seedlings of two rice cultivars differing in cold tolerance // Rice Sci. 2005. V. 12. P. 187-191.

174. Wang L., Nick P. Cold sensing in grapevine – which signals are upstream of the microtubular “thermometer” // Plant Cell Environ. 2017. V. 40. P. 2844–2857. https://doi.org/10.1111/pce.13051

175. Wang Y., Mostafa S., Zeng W., Jin B. Function and mechanism of jasmonic acid in plant responses to abiotic and biotic stresses // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. Art. 8568. https://doi.org/10.3390/ijms22168568

176. Weiss J., Egea-Cortines M. Transcriptomic analysis of cold response in tomato fruits identifies dehydrin as a marker of cold stress // J. Appl. Genet. 2009. V. 50. P. 311–319. https://doi.org/10.1007/BF03195689

177. Xia Q., Li B., Li Y., Guo Y., Zhou J., Li M. Determination of Fv/Fm from chlorophyll a fluorescence without dark adaptation by an LSSVM model // Plant Phenomics. 2023. V. 5. Art. 0034. https://doi.org/10.34133/plantphenomics.0034

178. Xu M., Li L., Fan Y., Wan J., Wang L. ZmCBF3 overexpression improves tolerance to abiotic stress in transgenic rice (*Oryza sativa*) without yield penalty // Plant Cell Rep. 2011. V. 30. P. 1949–1957. https://doi.org/10.1007/s00299-011-1103-1

179. Yadav S.K. Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review // Agron. Sustain. Dev. 2010. V. 30. P. 515-527. https://doi.org/10.1051/agro/2009050

180. Yang X., Wu C., Chen M., Ye T., Shen J., Zhao Q., Li Z., Zhang Q., Zhang Z., Dong J., Wu Y., Wang Y., Du Y., Zhang Z., Gu H., Qu L.J. NaCl Pretreatment Enhances the Low Temperature Tolerance of Tomato by Regulating Antioxidant Capacity, Photosynthesis, and Photosynthate Allocation // Front. Plant Sci. 2022. V. 13. Art. 833248. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.833248

181. Yeagle P.L. The Structure of Biological Membranes. Boca Raton: CRC Press, 1993. 688 p.

182. Yu C., Wang H., Yang S., Tang X., Duan M., Meng Q. Overexpression of endoplasmic reticulum omega-3 fatty acid desaturase gene improves chilling tolerance in tomato // Plant Physiol. Biochem. 2009. V. 47. P. 1102-1112. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.07.005

183. Zayner J.P., Antoniou C., Sosnick T.R. The amino-terminal helix modulates light-activated conformational changes in AsLOV2 // J. Mol. Biol. 2012. V. 419. P. 61-74. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.02.037

184. Zhang L., Guo X., Zhang Z. Cold-regulated gene LeCOR413PM2 confers cold stress tolerance in tomato plants // Gene. 2021. V. 764. Art. 145097. https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145097

185. Zhang L., Jiang X., Liu Q., et al. The HY5 and MYB15 transcription factors positively regulate cold tolerance in tomato via the CBF pathway // Plant Cell Environ. 2020. V. 43. P. 2712–2726. https://doi.org/10.1111/pce.13868

186. Zhang L., Zhao M., Tian Q., Zhang W. Comparative studies on tolerance of *Medicago truncatula* and *Medicago falcata* to freezing // Planta. 2011. V. 234. P. 445–457. https://doi.org/10.1007/s00425-011-1416-x

187. Zhang X., Fowler S.G., Cheng H., Lou Y., Rhee S.Y., Stockinger E.J. Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant Arabidopsis // Plant J. 2004. V. 39. P. 905-919. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02176.x

188. Zhao C., Wang P., Si T., Hsu C.-C., Wang L., Zayed O., et al. MAP kinase cascades regulate the cold response by modulating ICE1 protein stability // Dev. Cell. 2017. V. 43. P. 618–629. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.09.024

189. Zhu S.Q., Yu C.M., Liu X.Y., Ji B.H., Jiao D.M. Changes in unsaturated levels of fatty acids in thylakoid PSII membrane lipids during chilling-induced resistance in rice // J. Integr. Plant Biol. 2007. V. 49. P. 463-471. https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00429.x