

На правах рукописи



**СЕЛИВАНОВ АРСЕНИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ**

**РОЛЬ ДЕСАТУРАЗ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ФОРМИРОВАНИИ  
УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ *Arabidopsis thaliana*  
К ГИПОТЕРМИИ**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2019

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

**Научный руководитель:** **МОШКОВ Игорь Евгеньевич**  
доктор биологических наук

**Официальные оппоненты:** **ШАКИРОВА Фарида Миннихановна**  
доктор биологических наук, профессор,  
Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, г. Уфа,

**ЖИВУХИНА Елена Александровна**  
кандидат биологических наук, доцент,  
Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования Московский педагогический государственный университет, г. Москва.

**Ведущая организация:** Институт биологии – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук», г. Петрозаводск.

Защита состоится « 16 » апреля 2019 г. в 11.00 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, г. Москва, Ботаническая ул., 35. Факс: (499) 678-54-20; e-mail: [ifr@ippras.ru](mailto:ifr@ippras.ru).

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

Автореферат разослан «\_\_\_» февраля 2019 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Азаркович Марина Ивановна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Среди многообразия абиотических стрессовых воздействий гипотермия является одним из основных факторов, определяющих географическое распространение дикорастущих и сельскохозяйственных растений (Xin and Browse, 2000; Larcher, 2003). Выявление механизмов формирования адаптации к гипотермии имеет не только теоретическое значение, но и практическое применение, позволяя создавать новые стратегии улучшения устойчивости к пониженной температуре, в частности, хозяйственно ценных культур (Jan *et al.*, 2009).

Изучение влияния пониженных температур на растения сопряжено с определёнными сложностями вследствие того, что процесс формирования адаптации растений к гипотермии включает в себя совокупность физиологических, биохимических и молекулярных изменений. Как правило, в работах, направленных на изучение механизмов устойчивости, в качестве биологических моделей используются контрастные по устойчивости к гипотермии виды, а именно: морозостойкие (пшеница, ячмень, древесные растения средней полосы) и/или теплолюбивые (огурец, табак, рис). Изучение таких форм растений показало, что формирование устойчивости к гипотермии связано с накоплением растворимых сахаров (Туманов, 1979), а на клеточном уровне формирование устойчивости направлено на поддержание структурной целостности мембран (Lyons, 1973). Дальнейшие работы показали, что при снижении температуры в клетках образуются активные формы кислорода (АФК) (Scandalios, 1993). Если баланс сдвигается в сторону образования АФК, возникает окислительный стресс, последствия которого могут приводить к АФК-индуцируемой клеточной смерти. Сейчас, однако, признается, что АФК способны вмешиваться в работу путей передачи различных сигналов, влияя, таким образом, на возникновение защиты от стресса (Suzuki and Mittler, 2006).

Холодоустойчивые растения, у которых как причины холодового повреждения по сравнению с теплолюбивыми, так и формирование устойчивости к гипотермии по сравнению с морозостойкими, остаются менее изученными. К холодоустойчивым растениям принадлежит объект нашего исследования – *Arabidopsis thaliana* Heynh. (L.), устойчивость которого к гипотермии зависит от экотипа (Hannah *et al.*, 2006; Hasdai *et al.* 2006; Zuther *et al.*, 2012). Отсюда очевидно, что сравнение результатов, полученных ранее на разных экотипах, едва ли позволяет непротиворечиво судить о стратегии формирования устойчивости к холодовому стрессу растений этого вида. Принимая во внимание «постулаты», о которых речь шла выше, представлялось целесообразным выяснить: применимы ли они к выбранному объекту, а также ответить на вопрос, можно ли «закалить» растения *A. thaliana* (экотипа Columbia, Col-0). Если возможно, то вовлечены ли в закаливание ацил-липидные десатуразы, обеспечивающие структурную целостность клеточных мембран.

**Цель работы:** на основании детального анализа изменений физиологических, биохимических и молекулярно-биологических показателей, происходящих у растений *A. thaliana* Col-0 при холодовом закаливании, выявить роль десатураз жирных кислот (ЖК) в феномене акклиматизации холодоустойчивых растений к действию отрицательных температур.

В соответствие с этим были поставлены следующие задачи:

1. Выяснить пределы устойчивости незакаленных растений *A. thaliana* Col-0 к промораживанию, установить оптимальные условия закаливания растений и определить пределы устойчивости к промораживанию закаленных растений.
2. Выяснить, возникает ли окислительный стресс в процессе закаливания. В связи с этим определить изменения уровня содержания малонового диальдегида (МДА) и активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, каталаза).
3. Изучить во время закаливания растений изменения содержания растворимых сахаров (сахароза, глюкоза, фруктоза).
4. Охарактеризовать процессы фотосинтеза и дыхания во время закаливания растений.
5. Изучить изменения ультраструктуры хлоропластов в ходе закаливания.
6. Изучить изменения транскрипции генов ацил-липидных десатураз *A. thaliana* Col-0 во время закаливания.
7. Выявить изменения содержания ненасыщенных ЖК в мембранах при закаливании.

### **Научная новизна**

Впервые проведено комплексное исследование (на физиологическом, биохимическом и молекулярном уровнях) процессов, которые являются ключевыми для успешного формирования устойчивости к гипотермии холодоустойчивых растений. Эксперименты проводились на одном экотипе *A. thaliana* Col-0 с посуточным мониторингом показателей, характеризующих прохождение адаптации, что является отличительной чертой работы по сравнению с ранее проведенными аналогичными исследованиями.

Впервые изучены изменения ультраструктуры хлоропластов, активность антиоксидантных ферментов, содержание растворимых сахаров под воздействием гипотермии в динамике закаливания растений *A. thaliana* Col-0. Впервые исследована экспрессия генов, кодирующих ацил-липидные десатуразы жирных кислот у *A. thaliana* Col-0 в динамике закаливания, а также в первые часы холодовой экспозиции. Суточный мониторинг позволил сделать вывод о транзитном характере обусловленных закаливанием физиологических и биохимических процессов и выстроить единую картину основных этапов адаптации *A. thaliana* Col-0 к гипотермии.

### **Практическая значимость**

Результаты диссертационной работы помогают расширить имеющиеся знания о механизмах адаптации растений к гипотермии, в частности, могут быть использованы в качестве схем определения способности различных по устойчивости растений к

холодovому закаливанию. Полученные результаты, касающиеся экспрессии генов ацил-липидных десатураз в ходе закаливания, могут быть использованы для выбора наиболее перспективных вариантов трансформации культурных растений соответствующими генами с целью повысить их устойчивость к гипотермии.

### **Степень достоверности исследования**

При выполнении работы использовались современные биохимические, физиологические и молекулярно-биологические методы. Эксперименты проводились в достаточных для построения достоверной статистики биологических и аналитических повторностях. Выводы обоснованы экспериментально и отражены в печатных работах.

### **Апробация результатов**

Результаты диссертационной работы доложены на Всероссийской научной конференции «Факторы устойчивости растений в экстремальных природных условиях и техногенной среде» (Иркутск, 2013), I-ом Международном симпозиуме «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» (Казань, 2013), Международной научной конференции и школе молодых ученых «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий» (Калининград, 2014), II-ом Международном симпозиуме «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» (Уфа, 2017).

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проекты № 16-34-00967 мол\_а, № 11-04-01509-а).

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

1. В результате низкотемпературного закаливания растения *A. thaliana* Col-0 повышали устойчивость к гипотермии на 3°C.
2. В ходе закаливания окислительный стресс у *A. thaliana* Col-0 практически не развивался в связи с достаточной конститутивной активностью антиоксидантных ферментов.
3. В ходе закаливания *A. thaliana* Col-0 происходили адаптационные изменения метаболизма: повышение содержания транскриптов генов десатураз жирных кислот, адаптивные изменения ультраструктуры хлоропластов, накопление растворимых сахаров, увеличение содержания полиненасыщенных жирных кислот в составе липидов мембран и повышение индекса ненасыщенности.

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 13 работ, из которых 3 – в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК.

### **Структура диссертации**

Работа изложена на 132 страницах машинописного текста, содержит 4 таблицы, 18 рисунков и состоит из разделов: Введение, Обзор литературы, Объект и методы исследования, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы, Список использованной литературы. Список литературы включает 244 наименования, из них 209 на иностранных языках.

# ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

## ГЛАВА 1. Обзор литературы

В обзоре литературы рассматриваются общие вопросы устойчивости растений к холоду, включая фенотипические изменения, повреждения ультраструктуры органелл клетки, а также влияние гипотермии на фотосинтез и дыхание. Обсуждены адаптационные изменения, происходящие на молекулярном уровне, которые связаны с работой факторов транскрипции, вовлеченных в становление устойчивости к гипотермии. Особое внимание уделено развитию окислительного стресса и работе антиоксидатных ферментов, а также особенностям липидного состава клеточных мембран и функционированию десатураз ЖК при воздействии гипотермии.

## ГЛАВА 2. Объект и методы исследования

Объектом исследования служили растения *Arabidopsis thaliana* Heynh. (L.) экотипа Columbia (Col-0). Растения *Arabidopsis* Col-0 выращивали в грунте в камере фитотрона ИФР РАН при температуре 22°C, 8-часовом фотопериоде и освещенности 100 мкмоль/(м<sup>2</sup> с). Для постановки экспериментов использовали растения в возрасте шести-семи недель. Растения имели 22-24 листа, для проведения экспериментов отбирали листья с 10-го по 16-ый. Отбор проб для всех экспериментах осуществлялся в посуточной динамике.

Закаливание растений проводили в климатической камере KBW-240 (Binder, Германия) в условиях 8-часового фотопериода и освещенности 100 мкмоль/(м<sup>2</sup> с) в течение пяти суток при температуре 2°C. В качестве контроля использовали растения, не подвергавшиеся воздействию закалывающей температуры. Отбор образцов проводили каждые сутки в одно и то же время – 12.00. Для оценки эффективности закаливания растения *Arabidopsis* Col-0 промораживали при температурах от –1°C до –8°C в течение одних суток в климатической камере MIR-153 (Sanyo, Япония). После промораживания растения выдерживали 24 часа при 4°C в темноте, а затем переносили в нормальные для вегетации условия и культивировали в течение срока, достаточного для визуального определения их выживаемости. Степень повреждения растений оценивали по выходу электролитов из клеток листьев, который определяли путем измерения электропроводности водных экстрактов. (Campos *et al.*, 2003).

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли по накоплению продукта окисления липидов – МДА, содержание которого определяли в реакции с тиобарбитуровой кислотой (Жиров с соавт., 1982).

Общую активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по методу (Kumar and Knowles, 1993). Определение активности СОД проводили также в полиакриламидном геле (*in situ*). Для выделения белка использовали среду выделения, содержащую 50 мМ трис-НСl, рН 7,6, 3 мМ ЭДТА, 250 мМ сахарозы, 3,6 мМ цистеина, 5 мМ аскор-

биновой кислоты, 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ ДТТ, 2 мМ ФМСФ. Супернатант обессоливали в колонках PD-10 midiTrap G-25 (Sigma, США). Все операции проводили при 4°C. Содержание белка в пробах определяли реакцией с бичинхониновой кислотой с использованием Sigma BCA Kit согласно инструкции производителя. Для определения изоферментного состава СОД проводили электрофорез в нативных условиях по методу Орнштейна и Дэвиса (Ornstein, 1964; Davis, 1964) в 15% полиакриламидном геле в приборе Bio-Rad Mini PROTEAN Tetra (США). Гели окрашивали по методике (Miszalski *et al.*, 1998), сканировали и анализировали при помощи программы 1D-Scan (Scanalytics, США). Ингибиторный анализ типов СОД проводили при помощи 3 мМ KCN или 5 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Бараненко, 2006).

Активность каталаз измеряли по скорости распада H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> согласно методике (Kumar and Knowles, 1993).

Содержание глюкозы определяли глюкозооксидазным методом, сахарозу и фруктозу – по методу Roe *et al.* (Туркина, Соколова, 1971).

Измерения газообмена растений проводили на установке открытого типа с инфракрасным газоанализатором URAS 2T (Hartmann und Braun, Германия) согласно методике (Климов, 2003).

Для электронно-микроскопических исследований ультраструктуры хлоропластов срезы листьев растений просматривали в электронном микроскопе Libra-120 (Zeiss, Германия) при увеличении ×4000 (Трунова с соавт., 2003).

Для определения уровня транскрипции генов десатураз подбирали пары специфических праймеров к генам десатураз жирных кислот *ADS2* (AT2g31360; (F) СТАССТТGGTGGCATGTCCT, (R) АТТТGCCАССАТТСААГТСС), *FAD2* (AT3g12120; (F) GGCTGGATGACACAGTTGGTCT, (R) GTATTTCCCGTACCACTTGATTGC), *FAD7* (AT3g11170; (F) GATGGGTTCACGAGGAATTG, (R) CAGCCAATGCAAAGACGATA) и к референсному гену актина *ACT2* (AT3g18780; (F) AACAGCAGAGCGGGAAATTG, (R) GCAGCTTCCATGCCACAAA) с использованием базы данных TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) и online-ресурса Primer3Plus. Выделение общей клеточной РНК из листьев растений осуществляли при помощи набора для выделения РНК Sigma Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma, США) согласно протоколу производителя. Содержание РНК оценивали при помощи спектрофотометра ND-1000 (Nanodrop Inc., США). Чистоту выделенной РНК оценивали по соотношению OD<sub>260</sub> / OD<sub>280</sub>, которое всегда было не ниже 2 (Sambrook *et al.*, 1989). Реакцию обратной транскрипции проводили, используя набор реагентов и протокол Fermentas RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва), предварительно обработав полученную РНК ДНКазой Fermentas DNase I, RNase-free. ПЦР в реальном времени (RT-qPCR) проводили в амплификаторе АНК-32 (Синтол, Россия). Использовали набор реагентов и протокол Thermo Scientific Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2x) производства Thermo (Литва). Относительное содержание транскриптов рассчитывали при помощи ΔΔCt метода и

выражали в относительных единицах (относительный уровень экспрессии по сравнению со значением у незакаленных растений) (Pfaffl, 2004).

Для выделения интактных хлоропластов навеску листьев (5 г) гомогенизировали в буфере выделения (0,33 М сорбит, 50 мМ трицин, рН 8,0, 2 мМ ЭДТА, 1 мМ  $MgCl_2$ , 5 мМ меркаптоэтанол). Гомогенат фильтровали через 2 слоя Miracloth (США), фильтрат центрифугировали при 2000 g. Осадок ресуспендировали в буфере выделения, наслаивали на ступенчатый градиент перкола (40/80%) и центрифугировали при 5000 g. Целые хлоропласты отбирали на границе 40% и 80% перкола (Lang *et al.*, 2011). Для подтверждения целостности хлоропласты просматривали в световом микроскопе Axio Imager D1 (Karl Zeiss, Германия). Определение состава ЖК липидов мембран хлоропластов проводили методом газо-жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (Sidorov *et al.*, 2016).

Во всех экспериментах биологическая повторность измерений – 6-8-кратная, аналитическая – 4-6-кратная. Результаты экспериментов обработаны статистически. В таблицах и на гистограммах представлены средние значения опыта и их стандартные ошибки (Доспехов, 1977). Различия с  $P < 0,05$  считали значимыми.

### ГЛАВА 3. Результаты и обсуждение

**Устойчивость незакаленных и закаленных растений *A. thaliana* Col-0 к пониженной температуре.** На начальном этапе работы мы выбрали оптимальный режим закаливания – пять суток при 2°C. Показателем формирования устойчивости к



Рис. 1. Фенотипические изменения растений *A. thaliana* Col-0 после промораживания при -4°C.

отрицательным температурам служила выживаемость растений после промораживания. Показано, что пороговая температура повреждения незакаленных растений *Arabidopsis* Col-0 составляла -3°C. При -5°C наступала гибель всех незакаленных растений. Значительные повреждения закаленных растений наблюдали при -7°C, при -8°C все растения погибали. Фенотипические изменения незакаленных и закаленных растений через одну

неделю после суточного промораживания при -4°C отчетливо видны на рис. 1. Незакаленные растения большей частью погибли (рис. 1 слева), закаленные не только выжили, но и благополучно перешли в фазу цветения (рис. 1 справа).

Интенсивный рост выхода электролитов (рис. 2) у незакаленных растений начинался уже при -3°C, а у закаленных – при -6°C. Следовательно, барьерные



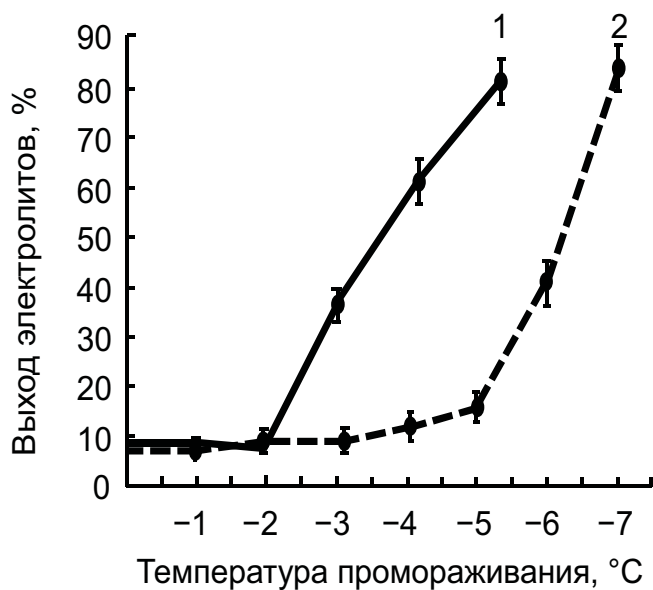


Рис. 2. Устойчивость листьев растений *A. thaliana* Col-0 после промораживания. 1 – незакаленные растения, 2 – закаленные растения.

же продолжительности самого закаливания. Решающее значение, по-видимому, имеет световой режим, при котором происходило закаливание растений.

**Интенсивность окислительного стресса.** Принято считать, что окислительный стресс, вызванный повышенным содержанием АФК, – одна из основных причин гибели растений при гипотермии. Возникновение окислительного стресса особенно «опасно» для теплолюбивых видов, в то время как для морозостойких и холодоустойчивых видов окислительный стресс не является критически важным повреждающим фактором (Miller *et al.*, 2008). Интенсивность окислительного стресса можно оценить по уровню

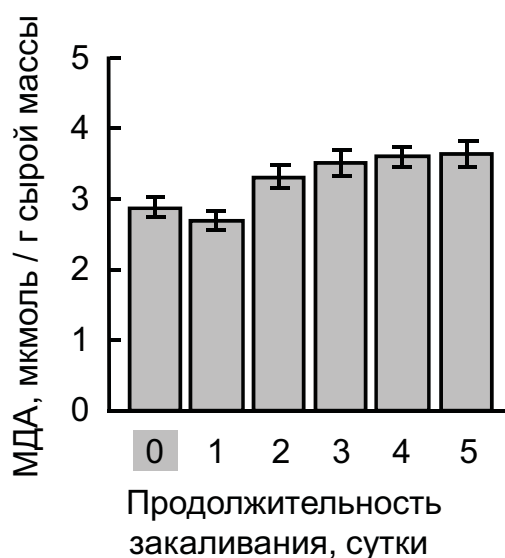


Рис. 3. Содержание МДА в процессе закаливания растений *A. thaliana* Col-0.

свойства мембран закаленных растений *Arabidopsis* Col-0 сохранялись при более низких температурах, чем у незакаленных экземпляров.

Таким образом, при выбранном режиме закаливания устойчивость растений *Arabidopsis* Col-0 к промораживанию повышалась как минимум на 3°C.

Сравнивая результаты, полученные в нашей работе, и сведения, имеющиеся в литературе (Hannah *et al.*, 2006; Zuther *et al.*, 2012), можно заключить, что способность растений *A. thaliana* переносить отрицательные температуры, скорее всего, в меньшей степени зависит от возраста закаливаемых растений, температуры закаливания, а также

перекисного окисления липидов (Shulaev and Oliver, 2006; Yamauchi *et al.*, 2008), показателем которого является содержание малонового диальдегида (МДА) (Pallavi *et al.*, 2012). Косвенным свидетельством наличия или отсутствия окислительного стресса может служить и изменение активности антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутаз (СОД), каталаз.

**Содержание МДА.** Полученные данные показывают, что в течение периода закаливания содержание МДА в листьях изменялось незначительно: на 15-17% по сравнению с контрольными растениями (рис. 3). Сходные результаты получены при исследовании холодоустойчивых рас-

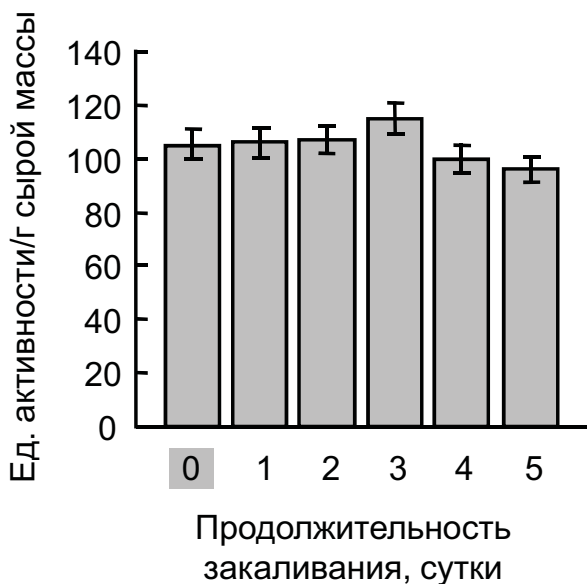


Рис. 4. Суммарная активность СОД в процессе закаливания растений *A. thaliana* Col-0.

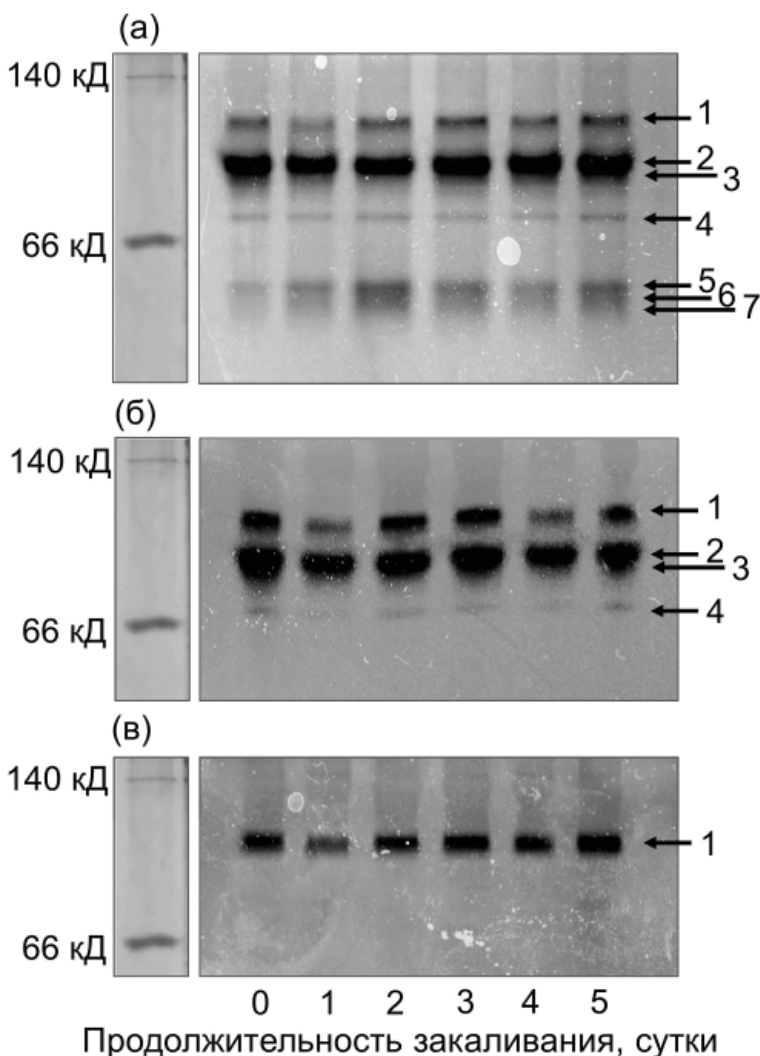


Рис. 5. Активность изоформ СОД в процессе закаливания растений *A. thaliana* Col-0.

тений картофеля (Нарайкина с соавт., 2014) и рапса (Moieni-Korbekandi *et al.*, 2014). Напротив, у теплолюбивых растений содержание МДА при гипотермии может возрастать в несколько раз (Лукаткин с соавт., 2002; Kim *et al.*, 2011), тогда как у морозостойких растений (овес, ячмень) содержание МДА возрастает лишь при экстремальных отрицательных температурах (Liu *et al.*, 2013; Kamran *et al.*, 2015).

То есть, у растений *A. thaliana* Col-0 при выбранном режиме закаливания окислительный стресс не выражен.

**Активность СОД.** В течение пяти суток воздействия закаливающей температуры значительных изменений суммарной активности СОД, измеренной *in vitro*,

не наблюдалось (рис. 4). Определение активности СОД *in situ* и идентификация типов СОД при помощи ингибиторного анализа (Holzmeister *et al.*, 2015), показали наличие одной изоформы Mn-СОД (рис. 5, полоса 1), активность которой не ингибировалась ни  $H_2O_2$ , ни KCN (рис. 5б, в); трех изоформ Fe-СОД (рис. 5, полосы 2, 3 и 4), ингибируемых  $H_2O_2$  (рис. 5в); трех изоформ Cu/Zn-СОД (рис. 5, полосы 5, 6 и 7), активность которых ингибировались как  $H_2O_2$ , так и KCN (рис. 5б, в). Таким образом, у *A. thaliana* Col-0 мы обнаружили все семь изоформ СОД.

Оцифровка электрофореграмм (рис. 5) подтвердила, что суммарная активность всех семи изоформ СОД в процессе закаливания практически не изменя-

лась, что совпадает с данными измерения *in vitro* суммарной активности СОД (рис. 4). Активность изоформ Cu/Zn-СОД изменялась транзиторно: ко вторым суткам закаливания активность увеличивалась в 2,5 раза, к четвертым суткам снижалась до уровня незакаленного контроля, а к пятым суткам вновь возрастала.

Рост активности Cu/Zn-СОД в конце закаливания мог иметь значение для выживания растений при промораживании, учитывая особенности внутриклеточной локализации Cu/Zn-СОД: в митохондриях, цитоплазме, апопласте и хлоропластах (Saibi and Brini, 2018). Можно допустить, что активация Cu/Zn-СОД сдерживала накопление АФК в местах их генерации, предотвращая развитие окислительного стресса.

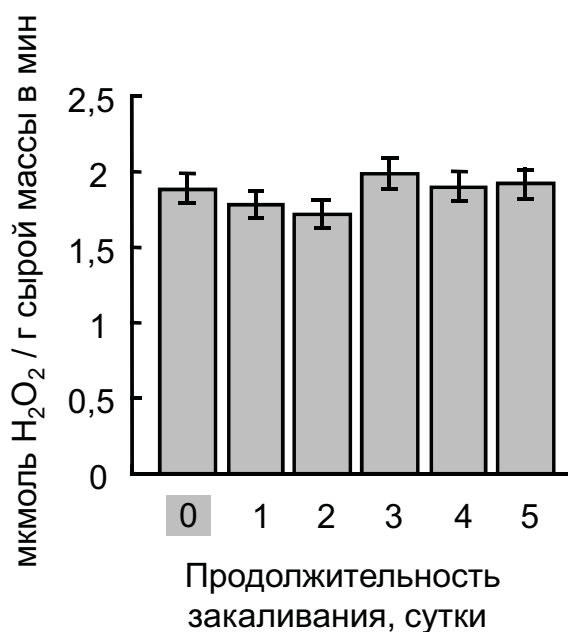


Рис. 6. Активность каталазы в процессе закаливания растений *A. thaliana* Col-0.

**Активность каталазы.** В процессе закаливания существенных изменений активности каталазы не наблюдалось (рис. 6). Небольшие колебания активности фермента не выходили за пределы статистической погрешности.

Сведения, имеющиеся в литературе, указывают, что активация каталазы в ответ на холодовый стресс наблюдается далеко не у всех растений (Kubo *et al.*, 1999; Distelbarth *et al.*, 2013; Leung, 2018). Однако важность каталазы для защиты растений от АФК нельзя преуменьшать. Так, имеются данные о том, что мутанты с недостаточным содержанием каталазы «склонны» к окислительному стрессу, вызванному как абиотическими, так и биотическими стрессорами (Sharma *et al.*, 2014).

Таким образом, отсутствие активации СОД и каталазы при закаливании свидетельствует в пользу того, что при низких положительных температурах растения *A. thaliana* Col-0 не испытывают действия окислительного стресса.

**Углеводный обмен растений.** Одним из важнейших факторов, обеспечивающих устойчивость растений к охлаждению, является наличие в клетке достаточного количества растворимых сахаров (Трунова, 1972; Ma *et al.*, 2009; Krasavina *et al.*, 2014; Tarkowski and Van den Ende, 2015). Мы показали, что в процессе закаливания в листьях растений *A. thaliana* Col-0 накопление растворимых сахаров коррелирует с устойчивостью к промораживанию. Так, к концу закаливания суммарное содержание растворимых сахаров в листьях растений выросло более чем в четыре раза, при этом доля фруктозы в общем составе сахаров возрастала до 20% (рис. 7).

Полученные результаты согласуются с имеющимися в литературе данными для 54 закаленных экотипов *A. thaliana*. Так, показана корреляция между накоплением

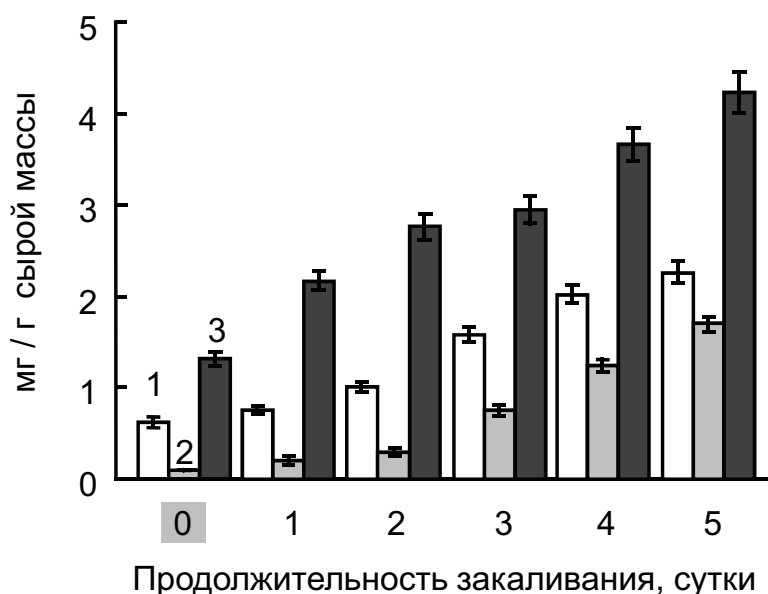


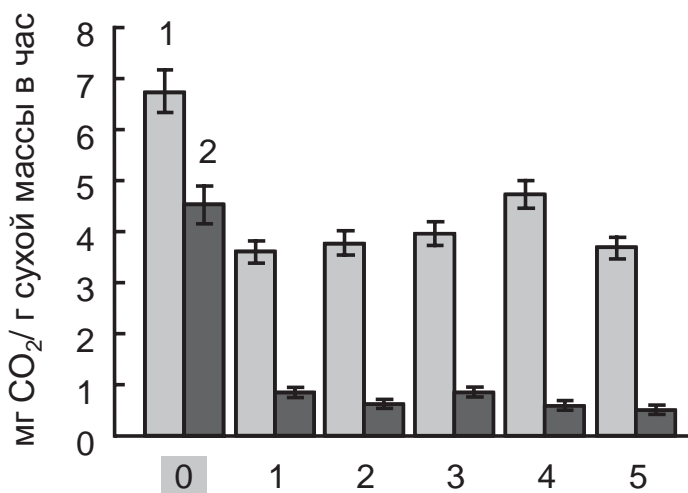
Рис. 7. Содержание растворимых сахаров в листьях *A. thaliana* Col-0 в процессе закаливания растений. 1 – глюкоза, 2 – фруктоза, 3 – сахароза.

растворимых сахаров и величиной  $LT_{50}$  (Zuther *et al.*, 2012), причем данные этих авторов не противоречат результатам, полученным ранее с гораздо меньшим набором экотипов (Rohde *et al.*, 2004; Korn *et al.*, 2008). Обсуждая роль сахаров при закаливании, стоит сравнить полученные нами результаты с результатами, касающимися растений-экстремофилов рода *Thellungeilla*. У 14 экотипов *Thellungeilla* при закаливании показана положительная корреляция между содержанием сахарозы и значением  $LT_{50}$ ,

однако, содержание фруктозы оказалось самым высоким у наиболее чувствительных к отрицательным температурам экотипов (Lee *et al.*, 2012). Учитывая генетическую близость растений *Thellungeilla* и *Arabidopsis*, можно предположить, что накопление сахаров видоспецифично, а различия в содержании сахаров – не единственная причина высокой устойчивости к отрицательным температурам закаленных растений. Если для морозостойких растений, например, пшеницы, важна антифризная функция сахаров, то при закаливании такая функция сахаров не является критически важной из-за отсутствия процесса льдообразования. Однако она может приобретать значение впоследствии, при промораживании. Более того, нельзя исключить участия сахаров в стабилизации клеточных мембран (Vereyken *et al.*, 2001; Hinch *et al.*, 2003), а также их значение как низкомолекулярных антиоксидантов (Bogdanović *et al.*, 2008).

**Интенсивность фотосинтеза и дыхания.** Описанное выше накопление растворимых сахаров позволило предположить, что при закаливании могли изменяться интенсивность и соотношение процессов фотосинтеза и дыхания. Мы показали, что во время закаливания растений *Arabidopsis* Col-0 снижались интенсивность как фотосинтеза, так и дыхания. После первых суток экспозиции при 2°C интенсивность фотосинтеза снижалась почти в два раза, а дыхания – примерно в 5,5 раз (рис. 8). В результате происходило увеличение отношения видимый фотосинтез/темновое дыхание, которое после пятых суток закаливания превышало контрольный показатель в четыре раза.

Снижение при закаливании интенсивности фотосинтеза и дыхания – реакция на холодовой стресс, проявляющаяся у разных типов растений, например, у закаленных растений рапса (Maciejewska *et al.*, 1984), растений озимой ржи (Hurry *et al.*, 1994) и пшеницы (Климов с соавт., 2004). Следовательно, можно допустить, что наблюдаемые



Продолжительность закаливания, сутки

Рис. 8. Интенсивность фотосинтеза (1) и дыхания (2) в процессе закаливания растений *A. thaliana* Col-0.

изменения могут служить мерой способности растения к холодовому закаливанию. Биологический смысл такой перестройки состоит в смене «энергетической стратегии», которая обеспечивает преобладание процессов синтеза над процессами распада. Это, в свою очередь, могло быть одной из причин повышения содержания сахаров (рис. 7).

**Изменение ультраструктуры хлоропластов.** Изменения интенсивности процессов фотосинтеза и дыхания подвели нас к необходимости детального исследования

структуры хлоропластов. Уже после первых суток закаливания площадь хлоропласта двукратно увеличивалась (рис. 9, таблица 1), снижаясь до размеров, сравнимых с контрольными растениями, лишь на пятые сутки охлаждения. На вторые сутки экспозиции площадь крахмальных зерен существенно уменьшалась (рис. 9, таблица 1), но после

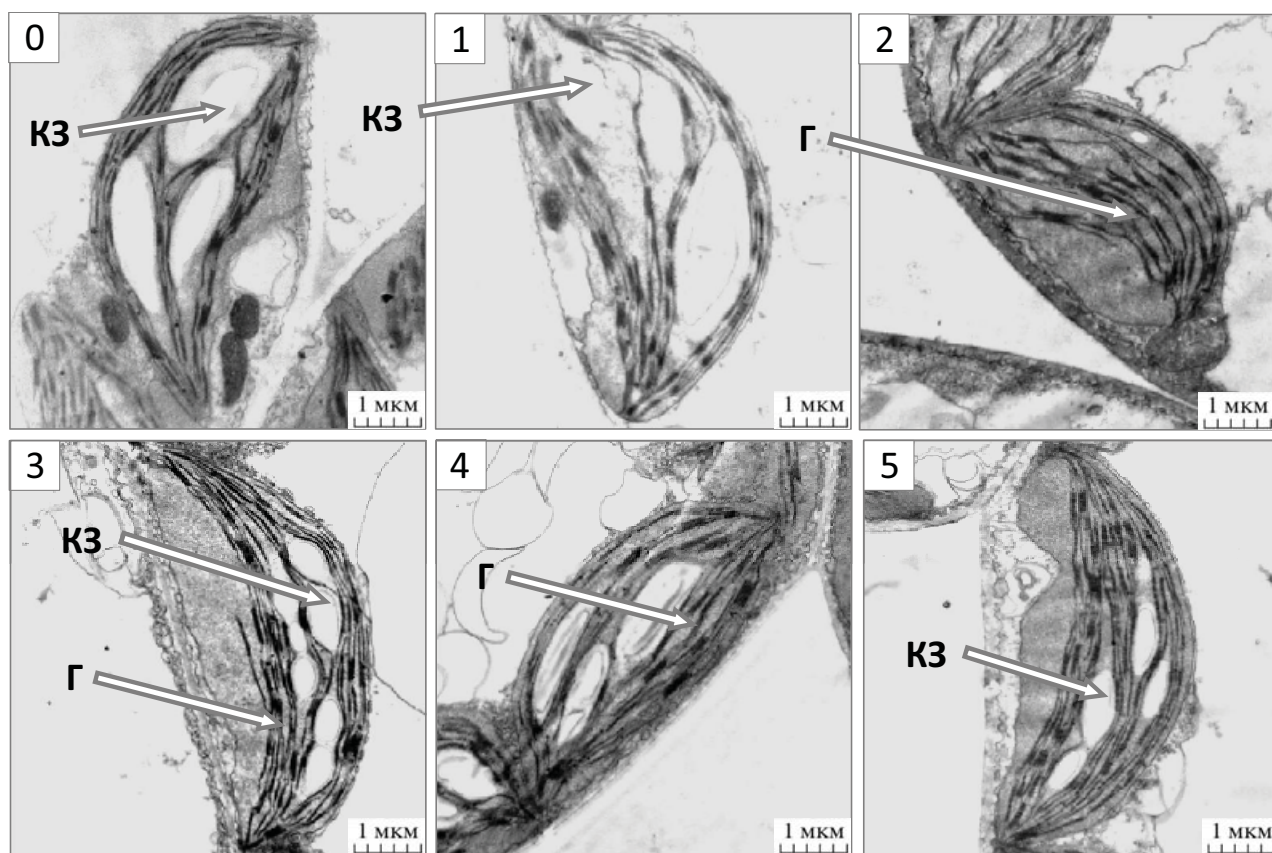


Рис. 9. Структура хлоропластов в процессе закаливания растений *A. thaliana* Col-0. КЗ – крахмальные зёрна, Г – граны. В левом верхнем углу – продолжительность закаливания, сутки.

**Таблица 1.** Изменение площади и числа структурных элементов хлоропластов листьев растений *A. thaliana* Col-0 в динамике низкотемпературного закаливания.

	Площадь хлоропластов, мкм <sup>2</sup>	Площадь крахмальных зерен, мкм <sup>2</sup>	Площадь гран, мкм <sup>2</sup>	Число крахмальных зерен, шт	Число гран, шт	Число тилакоидов в гране, шт	Число пластоглобул, шт	Общее число тилакоидов, шт
Контроль	7,20±0,25	0,42±0,03	0,02±0,004	2,04±0,07	18,81±0,44	5,43±0,12	2,22±0,19	102
1 сутки	14,28±0,35	0,83±0,01	0,02±0,003	2,40±0,04	22,00±0,52	4,84±0,12	9,98±0,18	107
2 сутки	12,94±0,29	0,08±0,005	0,02±0,004	1,58±0,03	23,30±0,43	4,99±0,11	5,38±0,17	116
3 сутки	14,15±0,26	0,14±0,01	0,03±0,002	2,91±0,06	20,11±0,45	6,21±0,13	4,70±0,21	125
4 сутки	11,95±0,31	0,57±0,009	0,05±0,003	3,51±0,07	19,89±0,37	6,81±0,12	10,04±0,23	135
5 сутки	6,70±0,21	0,38±0,05	0,05±0,004	2,95±0,06	17,81±0,29	8,33±0,14	5,50±0,13	148

Примечание: выборка – 100 хлоропластов.

третьих суток закаливания крахмальные зерна вновь появлялись. В ходе закаливания площадь гран увеличивалась в 2,5 раза, а общее число тилакоидов в хлоропласте по мере закаливания возрастало со 102 до 148; по сравнению с контрольными растениями за время холодого закаливания в среднем в пять раз увеличилось и число пластоглобул (таблица 1).

Изменение ультраструктуры хлоропластов при холодом стрессе – одно из наиболее часто детектируемых изменений. Такие изменения показаны для хлоропластов растений ячменя (Smillie *et al.*, 1987), а также шпината, огурца, хлопка (Kratsch and Wise, 2000).

Вероятно, рост числа тилакоидов направлен на поддержание фотосинтеза в стрессовых условиях, а сохранение фотосинтетической активности на фоне большего снижения интенсивности темнового дыхания ведет к увеличению содержания растворимых сахаров, которое в первые сутки закаливания могло увеличиваться за счет гидролиза крахмала. На вероятность такого развития событий указывают результаты изучения контрастных по способности к закаливанию экотипов *Arabidopsis* (Nagler *et al.*, 2015). Поскольку между третьими и пятыми сутками закаливания мы наблюдали рост содержания сахаров (рис. 7), а в хлоропластах «восстанавливалось» число крахмальных зерен (рис. 9е), можно предположить, что при закаливании могло происходить перераспределение сахаров между пластидами и цитозолем.

Таким образом, изменение ультраструктуры хлоропластов при закаливании

является реакцией, направленной на поддержание условий, необходимых для обеспечения процесса фотосинтеза при стрессе, с которым могут сталкиваться растения после закаливания.

**Содержание липидов и соотношение жирных кислот в хлоропластах.** Степень холодовой акклиматизации хлоропластов тесно коррелирует с общей устойчивостью растений к низким температурам и замораживанию (Crosatti *et al.*, 2013). Наличие в составе мембран липидов, содержащих ненасыщенные ЖК, понижает температуру фазового перехода и позволяет мембранам сохранять свои функции при воздействии гипотермии (Lyons, 1973; Zheng *et al.*, 2011). Причиной наблюдаемых нами изменений мембранного аппарата хлоропластов могло быть изменение метаболизма липидов. В связи с этим следующим этапом работы стало определение содержания ЖК липидов хлоропластов листьев *Arabidopsis Col-0*.

После закаливания общее содержание хлоропластных липидов увеличилось в 1,5 раза. Этот факт может объяснить рост как числа тилакоидов в гране, так и общего числа тилакоидов в хлоропласте (таблица 1). При закаливании снижалось относительное содержание пальмитиновой (16:0) и стеариновой (18:0) ЖК. С другой стороны, возрастало содержание полиненасыщенных ЖК: линоленовой (18:3), гексадекатриеновой (16:3) (таблица 2). Результатом изменений ЖК-состава липидов являлось увеличение величины индекса ненасыщенности с 1,756 до 1,909 (таблица 2).

Учитывая, что *Arabidopsis* – 16:3 растение, логично предположить, что при закаливании активировался хлоропластный (прокариотический) путь синтеза

**Таблица 2.** Содержание жирных кислот в хлоропластах листьев растений *A. thaliana Col-0* до и после закаливания, суммарное содержание жирных кислот ( $\Sigma_{\text{ЖК}}$ ) и индекс ненасыщенности (ИН).

ЖК	Незакаленные растения		Закаленные растения	
	Содержание ЖК, % от суммы	Содержание ЖК, мкг/г сырой массы	Содержание ЖК, % от суммы	Содержание ЖК, мкг/г сырой массы
16:0	33,3 ± 0,1	33 ± 1	29,0 ± 0,3	43 ± 2
16:1	6,8 ± 0,2	6 ± 0,2	6,0 ± 0,0	8 ± 0,2
16:2	0,5 ± 0,0	1 ± 0,1	0,7 ± 0,0	1 ± 0,1
16:3	10,5 ± 0,2	11 ± 0,2	13,7 ± 0,1	20 ± 0,5
18:0	1,1 ± 0,1	1 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1 ± 0,1
18:1	2,3 ± 0,0	2 ± 0,2	2,3 ± 0,1	3 ± 0,2
18:2	2,5 ± 0,1	3 ± 0,2	2,4 ± 0,1	4 ± 0,2
18:3	43,0 ± 0,4	43 ± 1,0	45,1 ± 0,3	67 ± 2,0
$\Sigma_{\text{ЖК}}$	100%	101 ± 1,0	100%	148 ± 4,0
ИН	1,756 ± 0,012	—	1,909 ± 0,009	—

глицеролипидов, когда полиненасыщенные триеновые ЖК могли этерифицироваться до МГДГ и ДГДГ – липидов мембран хлоропластов. Поскольку «восстановление» структуры хлоропластов (рис. 9) коррелировало с ростом как суммы 16:3 и 18:3 ЖК, так и с содержанием индивидуальных 16:3 и 18:3 ЖК (таблица 2), то регуляция распределения глицеролипидов между хлоропластами и цитозолем может иметь принципиальное значение для модуляции характеристик мембранных липидов, участвующих в адаптации к температурному стрессу.

**Изменение содержания мРНК генов десатураз.** Один из способов повышения текучести мембран и изменения их криочувствительности, которые позволяют восстанавливать текучесть мембран при низких температурах, – изменение уровня ненасыщенности ЖК. За внесение двойной связи в ациальные остатки ЖК отвечают десатуразы ЖК. Далее мы изучили изменение экспрессии генов, кодирующих десатуразы ЖК в ходе закаливания растений *Arabidopsis Col-0*.

Мы выбрали следующие гены: *ADS2* (AT2g31360), *FAD2* (AT3g12120) и *FAD7* (AT3g11170). Десатуразы, кодируемые *FAD2* и *FAD7*, относятся к группе  $\Delta 12/\omega 3$  десатураз. Из группы генов, кодирующих  $\Delta 9$  десатуразы, выбран ген *ADS2*. Десатуразы *ADS2* и *FAD2* локализованы в ЭПР, тогда как *FAD7* – в хлоропластах. Экспрессию перечисленных генов исследовали в течение пяти суток закаливания при помощи ПЦР в реальном времени (RT-qPCR).

Уже после первых суток воздействия холода содержание мРНК *ADS2* увеличилось более чем в 20 раз, демонстрируя плавный спад на вторые сутки, который продолжался до конца периода закаливания.

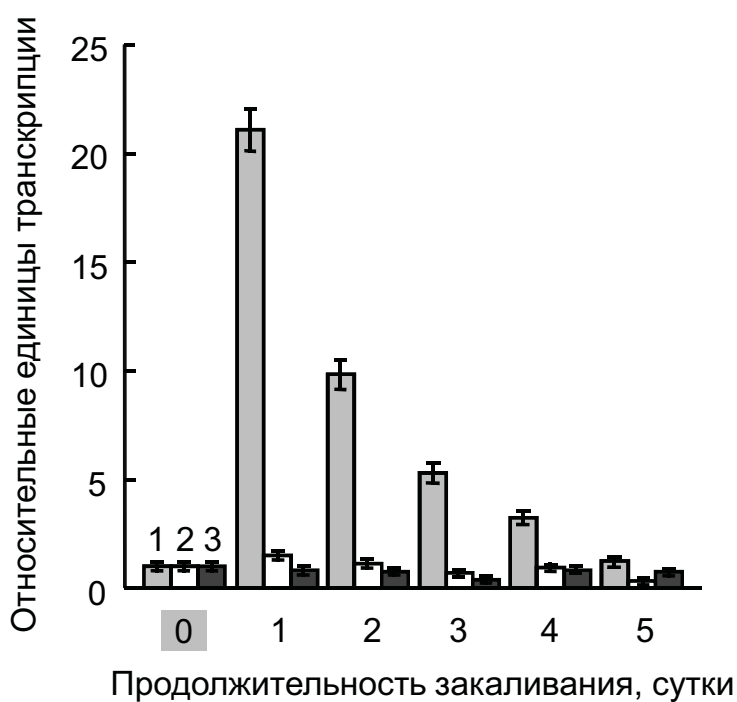


Рис. 10. Относительное содержание мРНК генов десатураз жирных кислот в листьях *A. thaliana Col-0* в процессе закаливания растений. 1- *ADS2*, 2 - *FAD2*, 3 - *FAD7*.

Однако и после пяти суток холодовой экспозиции содержание мРНК *ADS2* в два раза превышало контрольное значение. Содержание мРНК *FAD2* и *FAD7* в ходе закаливания практически не изменялось (рис. 10).

Выраженная активация гена *ADS2* в самом начале закаливания, по-видимому, объясняется важностью образования двойной связи в  $\Delta 9$ -положении для обеспечения субстратами последующих реакций десатурации. Так, анализ ЖК листьев мутанта *ads2 Arabidopsis* после действия пониженной температуры, показал, что по



сравнению с растениями дикого типа они содержали меньше 16:1, 16:2, 16:3 и 18:3 ЖК, тогда как уровень 16:0 и 18:0 ЖК достоверно выше. При этом устойчивость закаленных растений дикого типа выше, чем закаленных *ads2* мутантов (Chen and Thelen, 2013). Принимая во внимание эти сведения, можно заключить, что низкая температура вызывает сдвиг биосинтеза мембранных липидов в пользу ЭПР, а белок ADS2 необходим для возникновения ответа растений *Arabidopsis Col-0* на гипотермию.

Хотя мы не обнаружили изменений экспрессии *FAD2* и *FAD7* в ходе закаливания, участие этих генов и/или их белковых продуктов в ответе на гипотермию нельзя исключить. Показано, что при смене циклов тепло/холод (12 час 27°C/12 час 12°C) мутанты *Arabidopsis fad2* не способны регулировать вязкость плазмалеммы в той же мере, что экземпляры дикого типа (Martinière *et al.*, 2011). То есть, снижение температуры в отсутствие функционально активного белка FAD2 может приводить к aberrантным ответам на гипотермию. Кроме того, показано, что FAD2 может вовлекаться в регуляцию состава ЖК в хлоропластах, обеспечивая развитие листьев растений *Arabidopsis*, выращиваемых при низкой температуре (Botella *et al.*, 2016).

Сообщалось, что трансформация растений генами  $\omega$ 3-десатураз приводила к увеличению устойчивости к гипотермии. Так, растения табака, трансформированные геном *FAD7 Arabidopsis*, не погибали при температуре 1°C (Kodama *et al.*, 1994). Усиление экспрессии *FAD7* приводило к росту содержания триеновых и снижению содержания диеновых ЖК в листьях *Arabidopsis* (Routaboul *et al.*, 2000), а также в листьях табака (Murakami *et al.*, 2000).

Исследование экспрессии генов десатураз в ходе закаливания, проведенное в нашей работе, является не только ее отличительной чертой, но и перспективным направлением исследований, в том числе, для выявления возможных маркеров закаливания. Такие знания важны для понимания стратегия адаптации к частым сменам температурного режима у растений в их естественных условиях обитания.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя полученные в нашей работе данные, можно предложить общую схему формирования устойчивости *A. thaliana Col-0* к пониженным температурам. Графическое изображение последовательности предполагаемых событий представлено на рис. 11. Уже в первые часы холодного воздействия у *A. thaliana Col-0* увеличивается экспрессия гена *ADS2*, которая достигает своего максимального значения к концу первых суток закаливания (рис. 10). В результате может расти содержание в листьях белков десатураз, катализирующих образование двойной связи в положении  $\Delta 9$ . Образование мононенасыщенных ЖК с двойной связью в положении  $\Delta 9$ , которые, будучи субстратом для дальнейших реакций десатурации, является предпосылкой для синтеза полиненасыщенных ЖК. В итоге, может повышаться содержание липидов, включающих полиненасыщенные ЖК (таблица 2). Такая ситуация реализуется в хлоропластах, где

изменение липидного состава хлоропластных мембран необходимо для поддержания функциональной активности этих органелл, которое обеспечивается изменением системы гран, в частности, увеличением общего числа тилакоидов, которое подтверждено электронно-микроскопическими исследованиями (рис. 9, таблица 1). Как следствие, процесс фотосинтеза во время охлаждения не прекращается, хотя и предсказуемо снижается его интенсивность (рис. 8).

Уже с первых суток охлаждения мы наблюдали рост содержания растворимых сахаров (рис. 7), в то же время к концу вторых суток экспозиции при 2°C в хлоропластах полностью исчезали крахмальные зерна (рис. 9). По-видимому, распад крахмала позволяет повысить содержание глюкозы в первые сутки закаливания. Наблюдаемое падение интенсивности фотосинтеза происходит вместе с падением интенсивности дыхания, при этом, однако, интенсивность дыхания падает в большей степени, чем интенсивность фотосинтеза (рис. 8). В связи с этим происходит смещение реакций синтеза и распада сахаров в сторону накопления ассимилянтов – растворимых сахаров. Накопление растворимых сахаров, как известно, играет одну из ключевых ролей в защите



Рис. 11. Графическое представление о выявленных в работе событиях, происходящих при закаливании растений *A. thaliana* Col-0.

клетки от отрицательных температур (Трунова, 2007; Ma *et al.*, 2009; Sanghera *et al.*, 2011). При появлении избытка растворимых сахаров они начинают превращаться в запасные углеводы в виде крахмала, что выражается в появлении в хлоропластах крахмальных зерен (рис. 9, таблица 1).

В самом начале работы мы предположили два сценария событий, происходящих при закаливании: (1) повреждение и (2) адаптация растений при охлаждении. Первый основывается на главенствующей роли окислительного стресса в повреждении растений *Arabidopsis*. В этом случае главная роль в формировании устойчивости растений должна принадлежать антиоксидантной системе. Однако полученные данные показали невысокий уровень повреждений, вызванных окислительным стрессом (рис. 3); кроме того, не было выявлено заметной активации ферментов антиоксидантной защиты (рис. 4–6). Скорее, при закаливании растений *Arabidopsis* реализуется второй сценарий, при котором адаптивные изменения липидного состава клеточных мембран влекут за собой стабилизацию работы мембрано-связанных белок-липидных комплексов, что может приводить к снижению генерации АФК и снимать часть «нагрузки» с ферментов антиоксидантной системы.

Сейчас наиболее изученной, в том числе и нами, представляется последовательность экспрессии чувствительных к гипотермии генов. В тоже время орган-специфический характер ответа на гипотермию – один из очевидных, но ускользающих из рассмотрения аспектов. Отвечают ли на закаливание все ткани аналогичным образом? Если нет, то может ли сигнал об адаптации переноситься, в том числе, между корнями и надземной частью растения? Так, показано, что у растений риса, охлаждение корней вело к изменению протеомов проростков (Nielson *et al.*, 2013). Если же реакцию на гипотермию рассматривать как автономную, то следует допустить, что на уровне целого растения должны существовать системные сигналы ответа на гипотермию.

Таковыми системными сигналами могут быть фитогормоны, которые способны регулировать индуцируемые стрессом инвертазы (Trouverie *et al.*, 2004) и транспортеры гексоз (Hayes *et al.*, 2010). Сейчас известно, что АБК, образуемая в ответ на действие абиотических стрессоров, регулирует экспрессию *FRUCTAN EXOHYDROLASE (FEH)*, что может вызывать деградацию фруктанов (Ruuska *et al.*, 2007), часть которых идет на синтез сахарозы. Сахароза, содержание которой растет при закаливании (рис. 7), может гидролизироваться АБК-индуцируемыми инвертазами (Verhaes *et al.*, 2007). Глюкоза, образующаяся в результате гидролиза сахарозы, способна подавлять передачу сигнала АБК (Morita-Yamaturo *et al.*, 2004), а фруктоза – передачу сигнала этилена (Shari *et al.*, 2014). Следовательно, при закаливании фитогормоны могут управлять, в том числе, изменениями содержания сахаров. В связи с этим изучение роли фитогормонов при закаливании может стать важным продолжением настоящей работы.

Таким образом, выбранную нами схему исследования в виде периода закаливания и последующего тестирования его успешности при помощи прямого

промораживания можно рассматривать как адекватно работающую модель природных процессов, происходящих, например, в осенний период, когда на фоне снижения продолжительности светового периода за низкими положительными температурами следуют заморозки, приводящие к замораживанию растения.

## ВЫВОДЫ

1. Закаливание в течение 5 суток при 2°C растений *A. thaliana* Col-0 ведет к повышению на 3°C устойчивости к промораживанию.
2. В процессе закаливания растений *A. thaliana* Col-0 окислительный стресс не развивается, о чем свидетельствует отсутствие изменений уровня содержания малонового диальдегида и суммарной активности супероксиддисмутаза и каталаза.
3. В процессе закаливания метаболизм *A. thaliana* Col-0 поддерживается на уровне, способствующем адаптации к гипотермии, о чём свидетельствует рост количества растворимых сахаров и отношения фотосинтез/темновое дыхание в пользу фотосинтеза.
4. При закаливании происходит адаптация фотосинтетического аппарата *A. thaliana* Col-0: изменяется структура хлоропластов, происходит транзиторное изменение площади крахмальных зерен, увеличиваются число тилакоидов в гране и общее число тилакоидов.
5. В процессе закаливания проявляется выраженная транзиторная динамика содержания транскриптов гена *ADS2*, тогда как уровень экспрессии генов десатураз *FAD2* и *FAD7* практически не меняется.
6. Устойчивость к промораживанию, приобретаемая растениями *A. thaliana* Col-0 в результате закаливания, обеспечивается за счет повышения общего содержания жирных кислот и повышения индекса их ненасыщенности.
7. На основании полученных в работе данных можно заключить, что наряду с содержанием растворимых сахаров, изменения экспрессии гена *ADS2* – потенциальный молекулярный маркер успешного закаливания растений *A. thaliana* Col-0.

## Список публикаций по теме диссертации

### Статьи в журналах перечня ВАК:

1. Астахова Н.В., Попов В.Н., Селиванов А.А., Бураханова Е.А., Алиева Г.П., Мошков И.Е. Реорганизация ультраструктуры хлоропластов при низкотемпературном закаливании растений арабидопсиса // Физиология растений. 2014. Т. 61. С. 790–797.
2. Синькевич М.С., Селиванов А.А., Антипина О.В., Кропачева Е.В., Алиева Г.П., Суворова Т.А., Астахова Н.В., Мошков И.Е. Активность антиоксидантных ферментов у растений *Arabidopsis thaliana* при закаливании // Физиология растений. 2016. Т. 63. С. 777–782.

3. Селиванов А. А., Попов В. Н., Антипина О. В., Пчёлкин В. П., Цыдендамбаев В. Д., Мошков И. Е. Изменение содержания транскриптов генов десатураз жирных кислот растений арабидопсиса при адаптации к гипотермии // Физиология растений. 2017. Т. 64. С. 1–7.

#### **Тезисы и материалы конференций:**

4. Селиванов А.А., Синькевич М.С., Мошков И.Е. Типы и активность СОД в ходе низкотемпературной адаптации *Arabidopsis thaliana*. Мат. I Международного симпозиума «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений», Казань, 2013. С. 84.
5. Селиванов А.А., Мошков И.Е. Экспрессия генов десатураз *A. thaliana* Col-0 при длительном воздействии гипотермии. Мат. Всероссийской научной конференции «Факторы устойчивости растений в экстремальных природных условиях и техногенной среде», Иркутск, 2013. С. 227–229.
6. Селиванов А.А., Астахова Н.В., Мошков И.Е. Физиологические и биохимические особенности адаптации *A. thaliana* к гипотермии. X Межд. симпозиум «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования», Т. 1. Пущино, 2013. С. 144–148.
7. Селиванов А.А., Антипина О.В., Попов В.Н., Мошков И.Е. Интенсивность окислительного стресса и работа антиоксидантной системы у теплолюбивых и холодоустойчивых растений. Международная научная конференция и школа молодых ученых «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий», Калининград, 2014. С. 384–385.
8. Селиванов А.А., Астахова Н.В., Попов В.Н., Мошков И.Е. Изменения ультраструктуры хлоропластов листьев арабидопсиса при низкотемпературном закаливании. Сборник научной конференции «Биологические аспекты распространения, адаптации и устойчивости растений», Саранск, 2014. С. 180–183.
9. Антипина О.В., Астахова Н.В., Попов В.Н., Селиванов А.А. Изменение ультраструктурной организации хлоропластов растений табака и арабидопсиса в связи с формированием устойчивости к гипотермии. Мат. XI международного симпозиума «Новые и нетрадиционные растений и перспективы их использования», Москва, 2015. С. 188–192.
10. Астахова Н.В., Селиванов А.А., Попов В.Н., Бураханова Е.А., Алиева Г.П., Мошков И.Е. Изменение ультраструктуры хлоропластов листьев *Arabidopsis thaliana* при адаптации к гипотермии. VIII Съезд общества физиологов растений России «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий», Петрозаводск, 2015. С. 46.
11. Селиванов А.А., Астахова Н.В., Алиева Г.П., Мошков И.Е. Изменения транскрипции генов десатураз жирных кислот в листьях растений *Arabidopsis*

- thaliana* при адаптации к гипотермии. VIII Съезд общества физиологов растений России «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий», Петрозаводск, 2015. С. 474.
12. Селиванов А.А., Попов В.Н., Антитина О.В., Алиева Г.П., Мошков И.Е. Экспрессия генов ключевых десатураз жирных кислот при адаптации к гипотермии *A. thaliana*. Тезисы научной конференции с международным участием и школы молодых ученых «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма», Санкт-Петербург, 2016. С. 302–303.
13. Селиванов А.А., Антитина О.В., Попов В.Н., Мошков И.Е. Экспрессия генов ацил-липидных десатураз растений *Arabidopsis thaliana* при низкотемпературном закаливании. II Международный симпозиум «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений», Уфа, 2017. С. 407–409.