

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 513.234

doi: 10.17223/19988591/47/9

**Н.В. Нарайкина, В.Н. Попов, К.С. Миронов,
В.П. Пчелкин, Т.И. Трунова, И.Е. Мошков**

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва, Россия

Транскрипция генов десатураз жирных кислот хлоропластов при низкотемпературном закаливании *Solanum tuberosum* L.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 16-34-00604 мол_а).

Исследованы изменения относительного содержания транскриптов генов $\Delta 9$ -(*SAD*), $\Delta 12$ -(*FAD6*) и $\omega 3$ -(*FAD7*) десатураз хлоропластной локализации в процессе низкотемпературного закаливания (3°C , 7 сут) растений *Solanum tuberosum* L., сорт Юбилей Жукова. Среди изученных генов в начале периода закаливания обнаружено почти 3-кратное кратковременное увеличение относительного содержания транскриптов гена *FAD6*, кодирующего $\Delta 12$ -ацил-липидную десатуразу хлоропластов. В процессе закаливания содержание транскриптов гена *FAD7*, кодирующего $\omega 3$ ($\Delta 15$)-ацил-липидную десатуразу, поддерживалось на уровне вегетирующих растений, а гена *SAD*, кодирующего одну из стеароил-АПБ десатураз, – снижалось. Суммарная доля полиненасыщенных жирных кислот липидов хлоропластов в незакаленных растениях достигала почти 90% от общего содержания всех жирных кислот (ЖК) и за время закаливания поддерживалась на высоком конститутивном уровне. Обнаружено увеличение содержания пальмитиновой ($\text{C}_{16:0}$) кислоты, что может свидетельствовать о повышении интенсивности синтеза ЖК *de novo*. Кроме того, показано повышение содержания $\text{C}_{16:1}^{\Delta 7}$ кислоты, что также является важным для закаливания, поскольку поддержание текучести мембран определяется в том числе и содержанием ЖК с меньшим числом углеродных атомов. Сделано предположение, что повышение относительного содержания транскриптов гена *FAD6* в начале закаливания и поддержание транскрипции *FAD7* способствовало сохранению хлоропластных мембран в нативном состоянии и повышению устойчивости растений картофеля к гипотермии в процессе закаливания.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*; холодоустойчивость; промораживание; относительное содержание транскриптов; *SAD*; *FAD6*; *FAD7*; α -линоленовая кислота; полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК).

Введение

Проблема выживания растений в условиях действия низких температур становится все более актуальной в свете глобальных изменений кли-

мата и возрастающей потребности населения в продовольствии. В связи с этим исследования воздействия гипотермии на растения имеют не только фундаментальный, но и прикладной характер [1, 2]. Картофель – важная продовольственная культура, занимающая четвертое место в мире по объемам производства после пшеницы, риса и кукурузы. Развитие его клубней зависит от температурных условий выращивания. Реальная урожайность картофеля существенно ниже его потенциальной продуктивности, причем одним из главных ограничивающих урожай факторов является недостаточная устойчивость многих современных сортов к весенним заморозкам [3]. В связи с этим поиски путей повышения урожайности картофеля тесно связаны с фундаментальными исследованиями процессов формирования устойчивости растений к гипотермии.

В литературе широкое распространение получила теория, согласно которой при пониженных температурах происходит фазовый переход мембранных липидов, приводящий к снижению текучести мембран, инаktivации мембранных ферментов, потере барьерных свойств мембранами и как результат, к гибели клеток [4]. Клетки растений способны поддерживать текучесть мембран за счет работы ферментов из группы дегидрогеназ – десатураз жирных кислот (ЖК), катализирующих превращение одинарной (C–C) связи между атомами углерода в ацильных цепях ЖК в двойную (C=C). В ходе этой реакции насыщенные ЖК превращаются в ненасыщенные, что приводит к изменению свойств мембранных липидов. Десатуразы работают строго последовательно, продукт каждой реакции служит субстратом для последующей [5, 6]. Для высших растений большая часть информации о функциях и специфичности десатураз ЖК получена при изучении мутантов *Arabidopsis thaliana*, отдельных по специфичной десатуразной активности [7]. Известно, что десатуразы арабидопсиса (FAD – fatty acid desaturase) подразделяются на несколько подсемейств. Стеароил-АПБ десатураза (FAB2 или SSI2) является растворимой десатуразой и катализирует десатурацию стеариновой кислоты ($C_{18:0}$) до моноеновой олеиновой ($C_{18:1}^{\Delta 9}$) ЖК в связанной с ацилпереносящим белком (АПБ) форме. Кроме того, у арабидопсиса имеется $\Delta 9$ -ацил-липидная десатураза (ADS), которая участвует в десатурации $C_{16:0}$ в ЭПР. Микросомальная десатураза FAD2 и хлоропластная десатураза FAD6 представляют собой $\Delta 12$ -ацил-липидные десатуразы, которые участвуют в образовании диеновой линолевой кислоты ($C_{18:2}^{\Delta 9,12}$) в эндоплазматическом ретикулуме и пластидах соответственно. Микросомальная $\omega 3(\Delta 15)$ -десатураза FAD3 и пластидные $\omega 3(\Delta 15)$ -десатуразы FAD7, FAD8 участвуют в образовании линоленовой ($C_{18:3}^{\Delta 9,12,15}$) ЖК. Хлоропластные транс $\Delta 3$ -десатураза (FAD4 или FADA) и $\Delta 7$ -десатураза (FAD5) специфически образуют $C_{16:1}$ в ФГ и МГДГ соответственно. Кроме того, имеются специфичные $\Delta 8$ - и $\Delta 4$ -десатуразы сфинголипидов (SLD и DES) [8]. При этом основная роль в поддержании текучести мембран хлоропластов отводится $\Delta 12$ - и $\omega 3$ -ацил-липидным десатуразам, участвующим в образовании полинена-

сыщенных ЖК (ПНЖК) с двумя и тремя двойными связями соответственно [9,10]. Так, мутант *A. thaliana* по гену *FAD6* с неактивной хлоропластной $\Delta 12$ -десатуразой накапливал высокие концентрации пальмитолеиновой ($C_{16:1}$) и олеиновой ($C_{18:1}$) кислот. При этом уменьшалось содержание диеновых и триеновых ЖК в галактолипидах хлоропластов и наблюдалось снижение устойчивости к низкой температуре [7, 11].

Среди всех мембран растительной клетки хлоропластные мембраны играют особую роль в формировании устойчивости растений к низким температурам, поскольку именно в хлоропластах происходит фотосинтез, продукты которого служат основным источником энергии, необходимой для перестройки клеточной структуры и метаболизма, происходящей в период низкотемпературного закаливания [12]. В тилакоидных мембранах растений картофеля локализованы $\Delta 12$ -десатураза *FAD6*, а также единственная $\omega 3$ -десатураза *FAD7*, хотя, согласно данным литературы, в хлоропластах многих других растений присутствуют две $\omega 3$ -ацил-липидных десатуразы – *FAD7* и *FAD8*, причем экспрессия последней индуцируется низкой температурой [7, 8, 13]. Кроме того, у картофеля имеются растворимые стеароил-АПБ десатуразы (*SAD*) в хлоропластах, участвующие в образовании первой двойной связи в положении $\Delta 9$ у их субстрата – стеароил-АПБ. Именно данные гены выбраны нами для анализа изменений относительного содержания транскриптов в процессе закаливания растений картофеля к гипотермии. Цель работы – исследование роли $\Delta 9$ -, $\Delta 12$ - и $\omega 3(\Delta 15)$ -ацил-липидных десатураз хлоропластной локализации, задействованных в биосинтезе основных моно-, ди-, и триенасыщенных жирных кислот, в преобразованиях жирнокислотного состава мембран хлоропластов в процессе формирования холодостойкости растений картофеля при низкотемпературном закаливании.

Материалы и методики исследования

Объект исследования – растения картофеля (*Solanum tuberosum* L., с. Юбилей Жукова), которые выращивали из клубней в течение 3 недель в торфогрунте (50% верхового торфа, 50% пойменной земли с добавлением перлита) при температуре 22°C, освещенности 100 мкмоль/(м² с) и 16-часовом фотопериоде в камере фитотрона ИФР РАН (Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева, РАН). Сорт Юбилей Жукова в Госреестре с 2000 г., выведен ВНИИКХ им. А.Г. Лорха, описан как экологически пластичный, устойчивый к вирусным болезням, альтернариозу, среднеустойчивый к фитофторозу, парше обыкновенной и ризоктониозу [14]. По отношению к пониженным температурам почвы описан как относительно устойчивый [14]. Закаливание растений проводили в климатической камере KBW-240 «Binder» (Германия) в условиях 16-часового фотопериода и освещенности 100 мкмоль/(м² с) при температуре 3°C в течение 7 суток. В качестве контроля использовали растения, не подвергнутые действию закаливающей температуры.

Для оценки эффективности закаливания целые растения картофеля промораживали при температуре -2°C в течение 18 часов в климатической камере MIR-153 «Sanyo» (Япония), затем их переносили в нормальные условия выращивания (22°C) и через двое суток визуально оценивали выживаемость.

Для выделения РНК использовали листья 3–4-х ярусов, которые отделяли от растений контрольной группы (22°C) до начала закаливания, а также растений, находившихся в условиях закаливания при 3°C в течение двух часов, 1, 3, 5, и 7 суток.

Тотальную РНК из листьев растений выделяли с помощью набора Spectrum Plant Total RNA Kit «Sigma» (США) согласно протоколу производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили, используя набор реагентов и протокол MMLV RT Kit «Евроген» (Россия). Полученную кДНК использовали для проведения ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с помощью амплификатора CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System «Bio-Rad» (США), используя набор реагентов qPCRMix-HS SYBR kit «Евроген» (Россия). Расчет относительного содержания мРНК гена в пробе проводили с помощью вычисления величины нормализованной экспрессии ($\Delta\Delta C_T$). Эффективности ОТ-ПЦР, рассчитанные методом калибровочных кривых для всех пар праймеров, учитывали при проведении анализа [15]. Праймеры к исследуемым генам десатураз ЖК подобраны с использованием базы данных NCBI и интернет-ресурса Primer3Plus: *SAD* (LOC 102577562) – (F) CCAGTGAAGGACGCAGAGCAC, (R) GGGACTTCGTTGCTTGGCCC; *FAD6* (LOC 102590621) – (F) GCACGAAGACACAGCTTGGC, (R) TGACAGAGCCACCAGTGAGC; *FAD7* (LOC 102597672) – (F) TCTACCCCTTCCCTTGCTGGCA, (R) CATGCCCGTCCAGCAGACAGT; к референсным генам: фактор элонгации 1а *eEF1a* (LOC DQ252497) – (F) GGCCAACAGACAAACCCTCC, (R) GCCTCGTGGTGCATCTCAACA; рибосомальный белок *L2* (LOC 102577640) – (F) GGAGCCAAAAGATTGTGCCC, (R) AGCAGTTCCTCTTCACACGG. В качестве контроля ответной реакции на действие холода использовали ген белка теплового шока (БТШ) *HSE48* (LOC 102594276) – (F) TCCAGCTTCATTCGTCAACTCAAC, (R) CTCCTCCAGCTGGGATGGTT.

Интактные хлоропласты выделяли в буфере, содержащем 0,33 М сорбит, 50 мМ трицин pH 8.0, 2 мМ ЭДТА, 1 мМ MgCl_2 , 5 мМ меркаптоэтанол. Гомогенат фильтровали через 2 слоя Miracloth (США), центрифугировали при 2000 g, используя центрифугу K23D (Германия). Осадок ресуспендировали в буфере, наслаивали на ступенчатый градиент перкола (40/80%). Интактные хлоропласты отбирали на границе 40 и 80% перкола. [16]. Липиды хлоропластов подвергали метилированию посредством кипячения в смеси CH_3OH и CH_2COCl в течение 1 ч, как описано ранее [17]. В качестве внутреннего стандарта использовали маргариновую кислоту. Полученные метиловые эфиры ЖК очищали с помощью ТСХ на пластинке с силикагелем, в качестве растворителя применяя смесь гексан : эфир : уксусная кислота в соотношении 90:10:1, экстрагировали бензолом и анализировали методом ГЖХ-МС на приборе Agilent 7890A GC (США) [18]. Для оценки уровня не-

насыщенности ЖК в липидах мембран хлоропластов табака рассчитывали индекс ненасыщенности (ИН): $ИН = \sum P_i e_i / 100$, где P_i – содержание i -той ЖК (%), e_i – число двойных связей в i -той ЖК [17].

Все эксперименты проведены в 5–6 биологических повторностях и 3–4 аналитических. Статистическая обработка данных проведена в программе SigmaPlot 11. Данные представлены в виде средних значений и их стандартных ошибок.

Результаты исследования и обсуждение

Известно, что устойчивость растений к действию холода формируется в процессе закаливания при низких (но не повреждающих) температурах [2] и обуславливается структурно-функциональной перестройкой клеток, связанной с изменениями на молекулярном уровне, в зависимости от генотипа растений. Поэтому на первом этапе работы необходимо было убедиться, что закаливание растений картофеля при 3°C в течение 7 суток приводило к повышению их устойчивости к действию повреждающих температур. Поскольку низкие положительные температуры не вызывают у холодостойких растений визуальных повреждений, мы применили метод прямого промораживания растений с последующим определением их выживаемости. Показано, что после действия температуры -3°C в течение 18 ч растения обоих вариантов погибали, в связи с чем использовали температурную экспозицию -2°C в течение 18 ч. При этом режиме закаленные растения картофеля выживали, а незакаленные – погибали, что свидетельствует о достаточно высокой эффективности закаливания *Solanum tuberosum* L., сорта Юбилей Жукова (рис. 1).

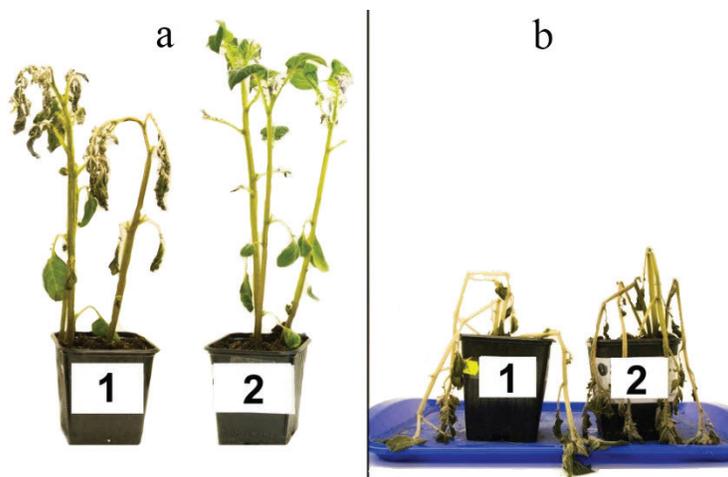


Рис. 1. Контрольные (1) и закаленные (2) растения картофеля через сутки после промораживания при температуре -2°C (a) и -3°C (b) в течение 18 ч. Автор фото Н.В. Нарайкина
[Fig. 1. Control (1) and cold-adapted (2) potato plants (one day after freezing at -2°C (a) and -3°C (b) for 18 hours). Photo by NV Naraikina]

Изменения относительного содержания транскриптов генов растворимой стеароил-АПБ десатуразы, $\Delta 12$ - и $\omega 3(\Delta 15)$ -ацил-липидных десатураз хлоропластов представлены на рис. 2. За единицу принято нормализованное содержание транскриптов исследуемых генов у незакаленных растений. Показано, что относительное содержание транскриптов гена *FAD7* оставалось стабильным и поддерживалось на уровне контроля. Для гена *FAD6* наблюдали кратковременное повышение содержания транскриптов в первые два часа закаливания, что соответствует данным литературы [19]. К пятым суткам закаливания у генов *FAD6* и *FAD7* наблюдали статистически значимое снижение относительного содержания транскриптов.

Характер экспрессии гена *SAD*, кодирующего $\Delta 9$ стеароил-АПБ десатуразу ЖК, резко отличался от остальных: относительное содержание его транскриптов снижалось в ходе закаливания в разной степени. Выбранный нами для исследования ген стеароил-АПБ десатуразы имеет высокую гомологию с геном *SSI2* арабидопсиса. Из данных литературы известно, что мутант арабидопсиса с «выключенным» геном *ssi2/fab2* имеет высокое содержание стеариновой ($C_{18:0}$) ЖК и низкое содержание олеиновой ($C_{18:1}$) ЖК. Несмотря на то, что в дополнение к *SSI2* в геноме *A. thaliana* присутствуют гены еще шести подобных ферментов, их экспрессия не способна компенсировать мутацию в *ssi2* [20]. То есть этот ген является ключевым в семействе генов стеароил-АПБ. Согласно данным литературы, этот фермент настолько активен, что практически весь новообразованный стеароил-АПБ быстро превращается в олеил-АПБ [5, 13, 21]. Поэтому мы связываем снижение относительного содержания мРНК данного гена с некоторым угнетением биосинтеза C_{18} жирных кислот в условиях холодостресса. Следует отметить, что в геноме картофеля обнаружено 13 генов, кодирующих растворимые ацил-АПБ десатуразы, образующие первую двойную связь, белки которых локализуются в строме хлоропластов, в связи с чем требуется дальнейшее изучение этой группы генов.

Данные по составу и содержанию ЖК липидов хлоропластов картофеля представлены в таблице. В липидах хлоропластов, выделенных из листьев контрольных растений как до, так и после закаливания, идентифицированы восемь различных остатков C_{16} - и C_{18} -ЖК, основными представителями которых являлись пальмитиновая ($C_{16:0}$), гексадекатриеновая ($C_{16:3}^{\Delta 7,10,13}$), линолевая ($C_{18:2}^{\Delta 9,12}$) и α -линоленовая ($C_{18:3}^{\Delta 9,12,15}$) ЖК, причем на долю α -линоленовой кислоты приходилось почти 60% от суммы ЖК хлоропластов. Следует отметить, что картофель, как и *A. thaliana*, относится к группе «16:3» растений, у которых в отличие от «18:3» растений в хлоропластах содержится значительное количество $C_{16:3}$ ЖК [10].

За время низкотемпературного закаливания ($3^{\circ}C$, 7 сут) состав ЖК мало изменялся. Анализ содержания ПНЖК показал, что в процессе закаливания происходило увеличение содержания пальмитиновой ($C_{16:0}$) кислоты, что может свидетельствовать о повышении интенсивности синтеза ЖК *de novo*.

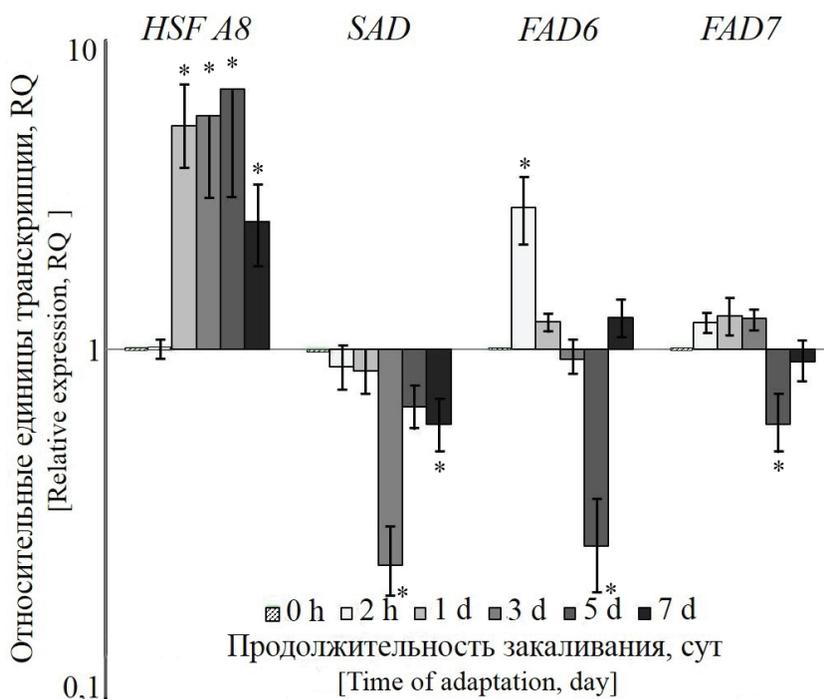


Рис. 2. Изменение относительного содержания транскриптов генов десатураз жирных кислот хлоропластов растений картофеля в динамике низкотемпературного закаливания (3°C, 7 сут). *SAD* – растворимая Δ9-АПБ десатураза, *FAD6* – Δ12-ацил-липидная десатураза, *FAD7* – ω3(Δ15)-ацил-липидная десатураза и *HSFA8* – БТШ А8 (контроль холодового воздействия). На оси Y «Относительные единицы транскрипции, RQ», на оси X «продолжительность закаливания, сут». RQ определено методом ΔΔC_T. Данные представлены в виде средних значений и их стандартных ошибок с использованием *t*-критерия Стьюдента. * – Статистически значимое отличие от контроля (*p* < 0,05) [Fig. 2. Changes in the transcript content of potato plant chloroplast fatty acid desaturase genes in the dynamics of low-temperature adaptation (3°C, 7 days). *SAD* - soluble Δ9-ACP desaturase, на *FAD6* - acyl-lipid Δ12-desaturase, *FAD7* - acyl-lipid ω-3(Δ15)-desaturase and *HSFA8* - HSF A8 (control of cold exposure). On the Y-axis - Relative expression, RQ; on the X-axis -Time of adaptation, day.*RQ was determined by the method ΔΔC_T. The data are expressed as the mean with standard error using Student's *t*-test (*p* < 0.05). *Statistically significant difference from control (*p* < 0.05)]

Соединение C_{16:0}-АПБ, являющееся предшественником C_{16:0} ЖК, используется в разных путях биосинтеза. Так, оно может в дальнейшем удлиняться до стеароил-АПБ с помощью фермента кетоацилсинтазы II (КАС II) или C_{16:0} ЖК может отделиться от АПБ с помощью ацил-АПБ тиоэстеразы (фермент, принадлежащий к классу ацил-АПБ-гидролаз) и подвергаться дальнейшей десатурации в липидсвязанной форме или транспортироваться из пластид в ЭПР. Таким образом, снижение активности фермента КАС II (одного из ферментов многокомпонентной синтазы ЖК), который удлиняет C_{16:0}-АПБ до C_{18:0}-АПБ, может приводить к повышению содержания пальмитиновой

кислоты. С другой стороны, повышение активности ацил-АПБ тиоэстеразы также может приводить к повышению содержания пальмитиновой ЖК. Так, в литературе имеются данные о повышении содержания транскриптов гена пальмитоил-АПБ тиоэстеразы почти в четыре раза после кратковременного действия закалывающей температуры на растения картофеля [19].

Кроме того, в настоящей работе наблюдали повышение содержания $C_{16:1}^{\Delta 7}$ ЖК, как известно, играющей положительную роль в поддержании текучести мембран, поскольку при низкой температуре необходимо не только повышение количества ЖК с большим числом двойных связей, но и увеличение содержания ЖК с меньшим числом углеродных атомов. Это может свидетельствовать о повышении активности $\Delta 7$ -десатуразы *FAD5*, которая специфически образует $C_{16:1}^{\Delta 7}$ ЖК в ФГ и МГДГ хлоропластов соответственно.

Согласно нашим данным, представленным в таблице, содержание α -линоленовой ЖК – главной ПНЖК хлоропластов, к седьмым суткам закалывания поддерживалось на высоком конститутивном уровне и составляло 50% от суммы ЖК. Представляет интерес сравнить эти показатели с данными литературы, согласно которым у картофеля сорта Невский происходило повышение содержания α -линоленовой кислоты после низкотемпературного закалывания с 38 до 43% [22], но эти показатели оставались даже ниже, чем у изученного нами сорта. Широко известно, что α -линоленовая кислота (и ее структурный аналог – гексадекатриеновая кислота) имеет уникальное значение в жизни растений [23] благодаря системе двойных связей. Она способна принимать спиральную конформацию и образовывать комплексы с мембранными липидами. Такие комплексы галактолипидов с белками обеспечивают построение фотосинтетических субъединиц хлоропласта, оптимальную пространственную ориентацию гидрофильных структур хлорофилла и возможность беспрепятственного переноса электронов в безводной среде. Следует отметить, что незначительное снижение содержания ПНЖК может быть связано как со снижением относительного содержания транскриптов гена *SAD* (рис. 2), кодирующего $\Delta 9$ стеароил-АПБ десатуразу ЖК, участвующую в образовании олеиновой кислоты, так и с интенсификацией пероксидного окисления липидов при резком снижении температуры в начале закалывания. Так, ранее нами показано возрастание его интенсивности у картофеля к третьим суткам низкотемпературного закалывания с последующим снижением до уровня вегетирующих растений к шестым суткам закалывания [24].

Таким образом, среди изученных генов $\Delta 9$ -, $\Delta 12$ -, $\omega 3$ -десатураз хлоропластов обнаружено кратковременное (через 2 ч закалывания) увеличение содержания транскриптов только гена *FAD6*, кодирующего $\Delta 12$ -ацил-липидную десатуразу хлоропластов. Относительная транскрипция гена *FAD7*, кодирующего единственную $\omega 3$ -десатуразу хлоропластов, оставалась на неизменном уровне, что, вероятно, способствовало поддержанию высокого конститутивного уровня триеновых ЖК.

**Изменение относительного содержания жирных кислот липидов хлоропластов
в результате низкотемпературного закаливания (3°C, 7 сут)
растений картофеля, мас % + m
[Change in the relative content of fatty acids of chloroplast lipids
after low-temperature adaptation (3°C, 7 days) of potato, mas% + m]**

Название ЖК [Name of FA]	Состав ЖК [FA composition]	
	мас [mas] %	мас [mas] %
	22°C (до закаливания) [before adaptation]	7 сут., 3°C (после закаливания) [7 days, 3°C after adaptation]
C _{16:0}	13,0±2,1	19,1±4,1*
C _{16:1} ^{Δ7}	0,0±0,0	3,1±2,0*
C _{16:1} ^{Δ9}	4,3±0,1	3,6±0,3*
C _{16:2} ^{Δ7,10}	1,7±0,1	1,2±0,4
C _{16:3} ^{Δ7,10,13}	12,6±0,2	12,1±0,4
C _{18:0}	0,9±0,1	1,1±0,7
C _{18:1} ^{Δ9}	1,2±0,1	1,2±0,1
C _{18:1} ^{Δ9,12}	9,0±0,3	8,4±0,2
C _{18:2} ^{Δ9,12,15}	57,2±0,9	50,2±1,7*
Сумма НЖК [Sum of SFA]	13,9±2,3	20,2±3,1*
Сумма ПНЖК [Sum of PUFA]	86,1±0,8	79,8±1,5*
Сумма ЖК [Sum of FA]	100	100
ИН [The Index of Unsaturation]	2,11	2,02

Примечание. Мас % – отражает содержание ЖК относительно суммы ЖК, ± m – стандартная ошибка, * – статистически значимое отличие от контроля (p < 0,05).
[Note. Mas % - Reflects FA content relative to the total of FA, ± m - standard error of the mean, * statistically significant difference from control (p < 0.05)].

Суммарная доля ПНЖК липидов хлоропластов картофеля в незакаленных растениях составляла почти 90% от общего содержания всех ЖК и за время низкотемпературного закаливания сохранялась на высоком уровне. Высокое содержание ПНЖК способствует поддержанию тилакоидных мембран хлоропластов в функциональном состоянии, что в свою очередь позволяет растениям картофеля реализовать прохождение других процессов, способствующих закаливанию растений к низким температурам [25].

Заключение

На основании полученных данных можно предположить, что закаливание изученного сорта картофеля в целом направлено на поддержание конститутивно высокого содержания ПНЖК хлоропластов в процессе закаливания и увеличение синтеза ЖК *de novo*. Повышение содержания транскриптов гена *FAD6* в начале этого периода, по-видимому, способствовало сохранению и поддержанию в активном состоянии пула Δ12-десатураз, осуществляющих синтез линолевой кислоты, благодаря чему растения были обеспечены достаточным количеством этих жизненно важных ЖК. Стабильно высокое содержание ПНЖК, входящих в состав мембранных липидов хлоропластов,

на протяжении всего периода закаливания способствует поддержанию тилакоидных мембран хлоропластов в функциональном состоянии, что позволяет растениям картофеля успешно закаливаться к гипотермии.

Литература

1. Liu Y., Dang P., Liu L., He C. Cold acclimation by the CBF–COR pathway in a changing climate: Lessons from *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell Reports*. 2019. Vol. 38. PP. 511–519. doi: [10.1007/s00299-019-02376-3](https://doi.org/10.1007/s00299-019-02376-3)
2. Трунова Т.И. Растение и низкотемпературный стресс (64-е Тимирязевские чтения). М. : Наука, 2007. 54 с.
3. Титов А.Ф., Акимова Т.В., Таланова В.В., Топчиева Л.В. Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур. М. : Наука, 2006. 143 с.
4. Lyons J.M. Chilling injury in plants // *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 1973. Vol. 24. PP. 445–466.
5. Лось Д.А. Молекулярные механизмы холодоустойчивости растений // *Вестник РАН*. 2005. Т. 75. С. 338–345.
6. Harwood J.L. Lipids: structure and function // *The biochemistry of plants* / ed. P.K. Stumpf. New York : Acad. Press, 1980. PP. 1–55.
7. Iba K. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance // *Ann. Rev. Plant Biol.* 2002. Vol. 53. PP. 225–244. doi: [10.1146/annurev.arplant.53.100201.160729](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100201.160729)
8. Chi X., Zhang Z., Chen N., Zhang X., Wang M., Chen M., Wang T., Pan L., Chen J., Yang Z., Guan X., Yu S. Isolation and functional analysis of fatty acid desaturase genes from peanut (*Arachis hypogaea* L.) // *PLoS ONE*. 2017. Vol. 12(12): e0189759. PP. 1–28. doi: [10.1371/journal.pone.0189759](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189759)
9. Ishizaki-Nishizawa O., Fujii T., Azuma M., Sekiguchi K., Murata N., Ohtani T., Toguri T. Low-temperature resistance of higher plants is significantly enhanced by a nonspecific cyanobacterial desaturase // *Nat. Biotechnol.* 1996. Vol. 14. PP. 1003–1006.
10. Lee S.H., Ahn S.J., Im Y.J., Cho K., Chung C.-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. and Biophys. Research Communications*. 2005. Vol. 330. PP. 1194–1198.
11. Miquel M., James D., Dooner H., Browse J. *Arabidopsis* requires polyunsaturated lipids for low-temperature survival // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. Vol. 90. PP. 6208–6212.
12. Crosatti C., Rizza F., Badeck F.W., Mazzucotelli E., Cattivelli L. Harden the chloroplast to protect the plant // *Physiologia Plantarum*. 2013. Vol. 147. PP. 55–63. doi: [10.1111/j.1399-3054.2012.01689.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01689.x)
13. Лось Д.А. Десатуразы жирных кислот. М. : Научный мир, 2014. 372 с.
14. Анисимов Б.В., Еланский С.Н., Зейрук В.Н., Кузнецова М.А. Сорты картофеля, возделываемые в России: справочное издание. М. : Агроспас, 2013. 144 с.
15. Rao X., Huang X., Zhou Z., Lin X. An improvement of the $\Delta\Delta C_T$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis // *Biostat. Bioinforma. Biomath.* 2013. Vol. 3. PP. 71–85.
16. Lang E.G.E., Mueller S.J., Hoernstein S.N.W., Porankiewicz-Asplund J., Vervliet-Scheebaum M., Reski R. Simultaneous isolation of pure and intact chloroplasts and mitochondria from moss as the basis for sub-cellular proteomics // *Plant Cell Rep.* 2011. Vol. 30. PP. 205–215. doi: [10.1007/s00299-010-0935-4](https://doi.org/10.1007/s00299-010-0935-4)
17. Маали Амири Р., Голденкова-Павлова И.В., Юрьева Н.О., Пчелкин В.П., Цыдендамбаев В.Д., Верещагин А.Г., Дерябин А.Н., Трунова Т.И., Лось Д.А., Носов А.М. Жирнокислотный состав липидов растений картофеля, трансформированных геном $\Delta 12$ -десатуразы цианобактерий // *Физиология растений*. 2007. Т. 54. С. 678–685. doi: [10.1134/S1021443707050056](https://doi.org/10.1134/S1021443707050056)

18. Сидоров Р.А., Жуков А.В., Верещагин А.Г., Цыдендамбаев В.Д. Низшие алкиловые эфиры жирных кислот из плодов бересклета // Физиология растений. 2012. Т. 59. С. 362–368. doi: [10.1134/S1021443712030156](https://doi.org/10.1134/S1021443712030156)
19. Koc I., Vatansever R., Ozyigit I. I., Filiz E. Identification of differentially expressed genes in chilling-Induced potato (*Solanum tuberosum* L.); a data analysis study // Appl. Biochem. Biotechnol. 2015. Vol. 177. PP. 792–811. doi: [10.1007/s12010-015-1778-9](https://doi.org/10.1007/s12010-015-1778-9)
20. Kachroo A., Shanklin J., Whittle E., Lapchuk L., Hildebrand D., Kachroo P. The Arabidopsis stearoyl-acyl carrier protein-desaturase family and the contribution of leaf isoforms to oleic acid synthesis // Plant Mol. Biol. 2007. Vol. 63. PP. 257–271. doi: [10.1007/s11103-006-9086-y](https://doi.org/10.1007/s11103-006-9086-y)
21. Жуков А.В. Жирные кислоты с очень длинной цепью в составе мембранных липидов растений // Физиология растений. 2018. Т. 65. С. 418–437. doi: [10.1134/S1021443718050187](https://doi.org/10.1134/S1021443718050187)
22. Лаврова В.В., Сысоева М.И., Матвеева Е.М. Жирнокислотный состав липидов листьев картофеля в условиях периодической и длительной гипотермии // Труды Карельского научного центра РАН. 2012. № 2. С. 91.
23. Верещагин А.Г. Липиды в жизни растений (66-е Тимирязевские чтения). М. : Наука, 2007. 78 с.
24. Нарайкина Н.В., Синькевич М.С., Дёмин И.Н., Селиванов А.А., Мошков И.Е., Трунова Т.И. Изменения активности изоформ СОД при низкотемпературной адаптации у растений картофеля (*Solanum tuberosum* L.) дикого типа и трансформированных геном $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы // Физиология растений. 2014. Т. 61. С. 359–366.
25. Нарайкина Н.В., Астахова Н.В., Дерябин А.Н., Синькевич М.С., Трунова Т.И. Адаптивные изменения ультраструктуры хлоропластов, содержания пигментов и сахаров при низкотемпературном закаливании растений картофеля: роль $\Delta 12$ -ациллипидной десатуразы // Известия РАН. Серия биологическая. 2018. № 6. С. 635–642.

*Поступила в редакцию 12.07.2019 г.; повторно 03.08.2019 г.;
принята 15.08.2019 г.; опубликована 27.09.2019 г.*

Авторский коллектив:

Нарайкина Наталья Владимировна – канд. биол. наук, н.с. лаборатории зимостойкости, ФГБУН «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН» (Россия, 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, 35).
E-mail: narai@yandex.ru

Попов Валерий Николаевич – канд. биол. наук, с.н.с. лаборатории зимостойкости, ФГБУН «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН» (Россия, 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, 35).
E-mail: vnpopov@mail.ru

Миронов Кирилл Сергеевич – канд. биол. наук, с.н.с. лаборатории клеточной регуляции, ФГБУН «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН» (Россия, 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, 35).
E-mail: ksmironov@gmail.com

Пчёлкин Василий Петрович – канд. хим. наук, с.н.с. лаборатории липидного обмена, ФГБУН «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН» (Россия, 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, 35).
E-mail: pchel_vp@ippras.ru

Трунова Тамара Ильинична – проф., д-р биол. наук, г.н.с. лаборатории зимостойкости, ФГБУН «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН» (Россия, 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, 35).
E-mail: trunova@ippras.ru

Мошков Игорь Евгеньевич – д-р биол. наук, зав. лабораторией зимостойкости, ФГБУН «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН» (Россия, 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, 35).
ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-9165-2351>
E-mail: ie.moshkov@mail.ru

For citation: Naraikina NV, Popov VN, Mironov KS, Pchelkin VP, Trunova TI, Moshkov IE. Fatty acid desaturase gene transcription at *Solanum tuberosum* L. cold adaptation. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2019;47:174-188. doi: 10.17223/19988591/47/9 In Russian, English Summary

**Natalia V. Naraikina, Valery N. Popov, Kirill S. Mironov,
Vasily P. Pchelkin, Tamara I. Trunova, Igor E. Moshkov**

K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Fatty acid desaturase gene transcription at *Solanum tuberosum* L. cold adaptation

The problem of the survival of plants under low temperatures becomes more relevant in the light of global climate change and the growing needs of the population. In this regard, studies of the impact of hypothermia on plants are not only fundamental, but also applied. Potatoes are an important food crop, ranking fourth in the world in terms of growing. The actual yield of potatoes is significantly lower than its potential productivity, and one of the limiting factors is the lack of resistance of many modern varieties to spring frosts. Decoding of the potato genome made it possible to use advances in molecular biology to study the role of individual genes and identify key proteins that can increase resistance to low temperature. It is widely known that under the action of low temperatures, there is a phase transition of membrane lipids, which is accompanied by a decrease in membrane fluidity and loss of their barrier properties and, as a result, by inactivation of enzymes. In response to changes in physical properties of membranes, cells activate protection systems, among which an important role is played by the cold-induced increase in the degree of unsaturation of fatty acids of membrane lipids. Therefore, one of the main goals of adaptation is the stabilization of membranes, for example, due to the work of enzymes, fatty acid desaturase (encoded by genes *FAD*), catalyzing the conversion of saturated fatty acids (FA) into unsaturated. Among all plant cell membranes, chloroplast membranes play a special role in the formation of plant resistance to low temperatures, since it is in chloroplasts that photosynthesis, the main source of energy necessary for the restructuring of metabolism during the adaptation period, takes place. The aim of the research was to study the role of chloroplast localized $\Delta 9$ -, $\Delta 12$ - and $\omega 3(\Delta 15)$ -desaturases in adaptive transformations of the fatty acid composition of chloroplast membranes when forming potato plant cold resistance during hardening.

The object of the study was potato plants (*Solanum tuberosum* L., cultivar Jubilee Zhukov), 3 weeks of age, grown in soil culture at a temperature of 22°C, illumination of 100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{ c})$ and 16-h photoperiod. Hardening of plants was carried out in the climatic chamber KBW-240 “Binder” (Germany) under 16-h photoperiod and illumination of 100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{ c})$ at a temperature of 3°C for 7 days. Controls were non-hardened plants. To assess the effectiveness of adaptation, whole plants were frozen at a temperature of 2°C for 18 hours in the climatic chamber MIR-153 “Sanyo” (Japan), and then transferred to the growing conditions to determine survival. The following genes of *FA* desaturases were selected for the study: *SAD* (encodes one of the soluble $\Delta 9$ -ACP-), *FAD6* (encodes membrane-bound acyl-lipid $\Delta 12$ -), *FAD7* (encodes membrane-bound acyl-lipid $\Delta 15(\omega 3)$ -desaturase). Protein products of these genes are localized in chloroplasts. Total RNA from leaves was isolated using Spectrum Plant Total RNA Kit “Sigma” (USA). The reverse transcription reaction was performed using a set of reagents and the Protocol MMLV RT Kit “Eurogen” (Russia). The resulting cDNA was

used for real-time PCR (q-PCR) using the amplifier CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System “Bio-Rad” (USA), using a set of reagents qPCRmix-HS SYBR kit “Eurogen” (Russia). The relative transcript content was calculated by calculating the normalized expression ($\Delta\Delta C_T$). Primers for the genes of FA desaturases were selected using the database NCBI and Internet resource Primer3Plus. Intact chloroplasts were isolated by centrifugation in a percol step gradient. Chloroplast lipids were methylated by boiling in a mixture of CH_3OH and CH_3COCl . The obtained LC methyl esters were analyzed by GL-MS using Agilent 7890A GC (USA). The experiments were conducted in 5-6 biological replicates and 3-4 analytical ones. Statistical data processing was performed using the program SigmaPlot 11. The data are presented as means and their standard errors.

We showed that the hardened potato plants survived after -2°C for 18 h, which indicates the successful hardening of *S. tuberosum*, Jubilee Zhukov cultivar (See Fig. 1). Among the studied genes $\Delta 9$ -, $\Delta 12$ - and $\omega 3$ -desaturases of chloroplasts, a short-term (after 2 h of adaptation) increase in the transcripts of the *FAD6* gene encoding acyl-lipid $\Delta 12$ -desaturase was found. The relative content of *FAD7* gene transcripts encoding $\omega 3$ -desaturase remained stable and maintained at the level of control. The character of *SAD* gene expression encoding $\Delta 9$ -ACP desaturase differed from the others: the relative transcript content decreased during adaptation (See Fig. 2). It should be noted that potatoes have 13 soluble $\Delta 9$ -ACP-desaturase genes forming the first double bond, whose proteins are localized in the stroma of chloroplasts. Perhaps, the studied gene is not cold-inducible. The total percentage of polyunsaturated fatty acids (PUFA) of lipids in chloroplasts of potato was high and constitutive in non-hardened plants accounted for almost 90% of the total content of all FA (See Table). Probably, therefore, in the process of adaptation there was no noticeable increase in the relative content of the transcripts of the studied genes $\Delta 12$ - and $\omega 3$ -desaturases of chloroplasts. During the period of low-temperature hardening, the part of PUFA, and especially α -linolenic acid, was maintained at a high level; there was an increase in the content of palmitic acid, which may indicate an increase in the intensity of synthesis of FA *de novo*. In addition, an increase in the content of $\text{C}_{16:1}^{\Delta 7}$ acid was observed, which is also important for adaptation. It is known that the fluidity of membranes with decreasing temperature is determined not only by the content of FA with a larger number of double bonds, but also by the content of FA with a smaller number of carbon atoms. Maintaining a high amount of PUFA helped to maintain the thylakoid membranes of chloroplasts in a functional state during the hardening process, which, in turn, allowed the potato plants to realize other processes of adaptation.

The paper contains 2 Figures, 1 Table and 25 References.

Key words: *Solanum tuberosum*; low-temperature adaptation; cold resistance; relative transcript content; *SAD*; *FAD6*; *FAD7*; α -linolenic acid; polyunsaturated fatty acids (PUFA).

Funding: The research was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Grant No 16-34-00604 mol_a).

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Liu Y, Dang P, Liu L, He C. Cold acclimation by the CBF–COR pathway in a changing climate: Lessons from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*. 2019;38(5):511-519. doi: 10.1007/s00299-019-02376-3
2. Trunova TI. Rastenie i nizkotemperaturnyy stress (64-e Timiryazevskoe chtenie) [Plants and Cold Stress (64th Timiryazev Memorial Lectures)]. Moscow: Nauka Publ.; 2007. 54 p. In Russian

3. Titov AF, Akimova TV, Talanova VV, Topchieva LV. Ustoychivost' rasteniy v nachal'nyy period deystviya neblagopriyatnykh temperature [Plant resistance during the initial period of adverse temperatures]. Moscow: Nauka Publ.; 2006. 143 p. In Russian
4. Lyons JM. Chilling injury in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 1973;24:445-466.
5. Los DA. Molecular mechanisms of cold tolerance in plants. *Herald of the Russian Academy of Sciences.* 2005;75(4):338-345. In Russian
6. Harwood JL. Lipids: structure and function. The biochemistry of plants. Stumpf PK, editor. New York: Acad. Press Publ.; 1980. 1-55 p.
7. Iba K. Acclimative response to temperature stress in higher plants: Approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Ann. Rev. Plant Biol.* 2002;53:225-244. doi: [10.1146/annurev.arplant.53.100201.160729](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100201.160729)
8. Chi X, Zhang Z, Chen N, Zhang X, Wang M, Chen M, Wang T, Pan L, Chen J, Yang Z, Guan X, Yu S. Isolation and functional analysis of fatty acid desaturase genes from peanut (*Arachis hypogaea* L.). *PLoS ONE.* 2017;12(12):1-28. doi: [10.1371/journal.pone.0189759](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189759)
9. Ishizaki-Nishizawa O, Fujii T, Azuma M, Sekiguchi K, Murata N, Ohtani T, Toguri T. Low-temperature resistance of higher plants is significantly enhanced by a nonspecific cyanobacterial desaturase. *Nat. Biotechnol.* 1996;14:1003-1006.
10. Lee SH, Ahn SJ, Im YJ, Cho K, Chung CC, Cho BH, Han O. Differential impact of low temperature on fatty acid unsaturation and lipoxygenase activity in figleaf gourd and cucumber roots. *Biochem. and Biophys. Research Communications.* 2005;330:1194-1198.
11. Miquel M, James D, Dooner H, Browse J. Arabidopsis requires polyunsaturated lipids for low-temperature survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993;90(13):6208-6212.
12. Crosatti C, Rizza F, Badeck FW, Mazzucotelli E, Cattivelli L. Harden the chloroplast to protect the plant. *Physiologia Plantarum.* 2013;147(1):55-63. doi: [10.1111/j.1399-3054.2012.01689.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01689.x)
13. Los DA. Desaturazy zhirnykh kislot [Fatty acid desaturases]. Moscow: Scientific World.; 2014. 372 p. In Russian
14. Anisimov BV, Elanskiy SN, Zeyruk VN, Kuznetsova MA. Sorta kartofelya, vozdeleyaemye v Rossii: Spravochnoe izdanie [Potato varieties cultivated in Russia: Reference edition]. Moscow: Agrosplas Publ.; 2013. 144 p. In Russian
15. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the $\Delta\Delta C_T$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat. Bioinforma. Biomath.* 2013;3:71-85.
16. Lang EGE, Mueller SJ, Hoernstein SNW, Porankiewicz-Asplund J, Vervliet-Scheebaum M, Reski R. Simultaneous isolation of pure and intact chloroplasts and mitochondria from moss as the basis for sub-cellular proteomics. *Plant Cell Rep.* 2011;30(2):205-215. doi: [10.1007/s00299-010-0935-4](https://doi.org/10.1007/s00299-010-0935-4)
17. Maali-Amiri R, Goldenkova-Pavlova IV, Yur'eva NO, Pchelkin VP, Tsydendambaev VD, Vereshchagin AG, Deryabin AN, Trunova TI, Los DA, Nosov AM. Lipid fatty acid composition of potato plants transformed with the $\Delta 12$ -desaturase gene from cyanobacterium. *Russian J Plant Physiology.* 2007;54(5):600-606. doi: [10.1134/S1021443707050056](https://doi.org/10.1134/S1021443707050056)
18. Sidorov RA, Zhukov AV, Vereshchagin AG, Tsydendambaev VD. Occurrence of fatty acid lower -alkyl esters in euonymus fruits. *Russian J Plant Physiology.* 2012;59(3):326-332. doi: [10.1134/S1021443712030156](https://doi.org/10.1134/S1021443712030156)
19. Koc I, Vatansever R, Ozyigit I I, Filiz E. Identification of differentially expressed genes in chilling-Induced potato (*Solanum tuberosum* L.); a data analysis study. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2015;177(4):792-811. doi: [10.1007/s12010-015-1778-9](https://doi.org/10.1007/s12010-015-1778-9)
20. Kachroo A, Shanklin J, Whittle E, Lapchuk L, Hildebrand D, Kachroo P. The Arabidopsis stearyl-acyl carrier protein-desaturase family and the contribution of leaf isoforms to oleic acid synthesis. *Plant Mol. Biol.* 2007;63(2):257-271. doi: [10.1007/s11103-006-9086-y](https://doi.org/10.1007/s11103-006-9086-y)
21. Zhukov AV. Very Long-chain fatty acids in composition of plant membrane lipids. *Russian J Plant Physiology.* 2018;65(6):784-800. doi: [10.1134/S1021443718050187](https://doi.org/10.1134/S1021443718050187)

22. Lavrova VV, Sysoeva MI, Matveeva EM. Zhirnokislotnyy sostav lipidov list'ev kartofelya v usloviyakh periodicheskoy i dlitel'noy gipotermii [Lipid fatty acids in potato leaves under periodic and long-term hypothermia]. *Transactions of the Karelian Research Centre of RAS*. 2012;2:91-95. In Russian
23. Vereshchagin AG. Lipidy v zhizni rasteniy (66-e Timiryazevskoe chtenie) [Lipids in life of plants (The 66th Timiryazevsky reading)]. Moscow: Nauka Publ.; 2007. 78 p. In Russian
24. Naraikina NV, Sin'kevich MS, Demin IN, Selivanov AA, Moshkov IE, Trunova TI. Changes in the activity of superoxide dismutase isoforms in the course of low-temperature adaptation in potato plants of wild type and transformed with $\Delta 12$ -acyl-lipid desaturase gene. *Russian J Plant Physiology*. 2014;61(3):332-338. doi: [10.1134/S1021443714030091](https://doi.org/10.1134/S1021443714030091)
25. Naraikina NV, Astakhova NV, Deryabin AN, Sinkevich MS, Trunova TI. Adaptive alterations in the ultrastructure of chloroplasts, pigments and sugar content at low temperature hardening of potato plants: The role of $\Delta 12$ -acyl-lipid desaturase. *Biology Bulletin*. 2018;6:635-642. doi: [10.1134/S0002332918060097](https://doi.org/10.1134/S0002332918060097) In Russian

Received 12 July 2019; Revised 3 August 2019;

Accepted 15 August 2019; Published 27 September 2019

Author info:

Naraikina Natalia V, Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Laboratory of Winter Hardiness, K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya Str., Moscow 127276, Russian Federation.

E-mail: narai@yandex.ru

Popov Valery N, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Winter Hardiness, K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya Str., Moscow 127276, Russian Federation.

E-mail: vnpopov@mail.ru

Mironov Kirill S, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Cell Regulation, K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya Str., Moscow 127276, Russian Federation.

E-mail: ksmironov@gmail.com

Pchelkin Vasily P, Cand. Sci. (Chem.), Senior Researcher, Laboratory of Lipid Metabolism, K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya Str., Moscow 127276, Russian Federation.

E-mail: pchel_vp@ippras.ru

Trunova Tamara I, Dr. Sci. (Biol.), Chief Researcher, Laboratory of Winter Hardiness, K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya Str., Moscow 127276, Russian Federation.

E-mail: trunova@ippras.ru

Moshkov Igor E, Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Winter Hardiness, K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, 35 Botanicheskaya Str., Moscow 127276, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-9165-2351>

E-mail: ie.moshkov@mail.ru