

УДК 581.1

ИЗМЕНЕНИЯ В ЖИРНОКИСЛОТНОМ СОСТАВЕ И В СОДЕРЖАНИИ ЛИПИДОВ ЛИСТЬЕВ КАРТОФЕЛЯ ПРИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМ ЗАКАЛИВАНИИ: РОЛЬ $\Delta 12$ -АЦИЛ-ЛИПИДНОЙ ДЕСАТУРАЗЫ

© 2020 г. Н. В. Нарайкина^а, *, В. П. Пчёлкин^а, В. Д. Цыдендамбаев^а, Т. И. Трунова^а

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: narai@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.07.2019 г.

После доработки 18.07.2019 г.

Принята к публикации 25.07.2019 г.

Изучен качественный состав и изменения абсолютного содержания ЖК липидов в листьях контрольных и трансформированных геном *desA* $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC 6803 растений картофеля (*Solanum tuberosum* L., сорт Десница) при низкотемпературном закаливании (6 сут, 5°C). Показано, что растения обоих генотипов в процессе адаптации повышали устойчивость к заморозкам, но трансформанты по этому показателю существенно превосходили контрольные растения. В результате закаливания в листьях контрольных растений происходило повышение суммы этерифицированных ЖК почти на 25% как за счет падения уровня содержания насыщенных ЖК, так и за счет повышения количества полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) почти на 30%; рост абсолютного содержания последних происходил за счет линолевой ($C_{18:2}$) и линоленовой ($C_{18:3}$) кислот. Листья трансформированных растений уже до закаливания включали почти такое же количество ЖК, и особенно ($C_{18:3}$) кислоты, как и контрольные растения после прохождения процесса закаливания. В связи с этим фактом у закаленных трансформантов наблюдалось не столь существенное, как у контроля, повышение суммы ЖК, но при этом содержание линолевой ($C_{18:2}$) кислоты возрастало на 30% (несколько повышался и расчетный индекс активности $\Delta 12$ -десатураз). Повышение содержания гексадекатриеновой ($C_{16:3}$) кислоты у трансформантов, вероятно, происходило в результате активации низкой температурой собственных $\omega 3$ -десатураз картофеля. Полученные данные позволяют сделать предположение, что более высокая устойчивость трансформантов, по сравнению с контролем, связана с конститутивно повышенным содержанием ПНЖК, что предопределило более эффективное прохождение процессов закаливания к заморозкам.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*, низкотемпературное закаливание, холодоустойчивость, $\Delta 12$ -ацил-липидная десатураза, трансформанты, жирнокислотный состав липидов

DOI: 10.31857/S0015330320020116

ВВЕДЕНИЕ

Исследования механизмов устойчивости растений к действию гипотермии, являющейся одной из фундаментальных проблем физиологии растений, становятся все более актуальными в связи с глобальными изменениями климата и вопросом продовольственной безопасности постоянно возрастающей численности населения Земли.

Среди трех основных групп растений (морозостойкие, холодостойкие, теплолюбивые), различающихся по степени устойчивости к низкой

температуре и льдообразованию, остаются наименее изученными механизмы закаливания и устойчивости к гипотермии холодостойких растений [1–3]. Известно, что относящиеся к этой группе растения, в отличие от теплолюбивых, выживают после действия любых низких положительных температур, а в переохлажденном состоянии даже после заморозков. От морозостойких растений они отличаются отсутствием свойств устойчивости к образующемуся при отрицательных температурах льду.

В связи с этими особенностями механизмов устойчивости и повреждения следует предположить, что закаливание холодостойких растений к гипотермии должно быть направлено, главным образом, на сохранение структурно-функцио-

Сокращения: ОС – окислительный стресс, ИН – индекс ненасыщенности, FAD – fatty acid desaturase, МЭЖК – метиловые эфиры ЖК; LDR – linoleyl-desaturase ratio, ODR – oleoyl-desaturase ratio, SDR – stearoyl-desaturase ratio.

нального состояния клеток в течение длительного пребывания при низких положительных температурах и в условиях заморозка до начала процесса льдообразования в растениях.

Наиболее уязвимой к действию гипотермии в клетке является мембранная система, изменение структуры которой приводит к нарушению ее функций и в итоге к необратимым повреждениям и гибели растений. Как известно, одной из важнейших причин повреждения мембран при снижении температуры рассматривается фазовый переход мембранных липидов из жидкокристаллического состояния в твердый гель, что приводит к потере их текучести. В результате, с одной стороны, повышается проницаемость мембран для ионов, а с другой – увеличивается энергия активации ферментов, связанных с мембраной. Скорость реакций, катализируемых мембранными ферментами, снижается после фазового перехода быстрее, чем скорость реакций, связанных с растворимыми энзимами. Все это приводит к неблагоприятным сдвигам в обмене веществ, резкому возрастанию количества эндогенных токсинов [4]. Часто повреждения структуры мембран и ее липидных компонентов связывают с активацией под действием гипотермии свободно-радикальных процессов и образованием АФК, которые атакуют полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), что сопровождается повышением содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Исходя из этих предположений, сначала нами было изучено продолжительное действие низких закалывающих температур на процессы окислительного стресса (ОС) картофеля, являющегося типичным представителем холодостойких растений. Полученные данные [5, 6] показали, что, в отличие от теплолюбивых растений, у картофеля при длительной гипотермии, не сопровождающейся образованием льда, не происходит существенного накопления АФК и активации процессов ПОЛ, т.е. мембраны этих растений, в том числе мембраны хлоропластов и митохондрий, которые являются основными продуцентами АФК при нарушении их функциональной активности, достаточно устойчивы к ОС.

Поскольку адаптивная способность растений к гипотермии зависит от того, насколько долго они могут сохранять жидкостное состояние мембран и предотвращать фазовый переход липидов в бислое, у них выработался механизм снижения температуры фазового перехода за счет увеличения доли ПНЖК. Повышение их содержания осуществляют ферменты дегидрогеназного типа – десатуразы ЖК, катализирующие образование двойных (олефиновых) связей в ацильных цепях ЖК [7]. Известно, что мембранные липиды растений, выращенных при пониженной температуре, характеризуются, как правило, повышенным содержанием ПНЖК, т.е. величина индекса ненасыщенности

(ИН) ЖК находится в обратной зависимости от снижения температуры [8]. Однако уровень ИН ЖК мембранных липидов при гипотермии определяется не только температурой, но и генотипом растений, в том числе экспрессией генов десатураз и их активностью в условиях гипотермии. В нашей предыдущей работе [9] это было подтверждено на трансформированных растениях картофеля с введенным геном *desA* $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы цианобактерий, характеризующихся увеличенной долей ПНЖК в мембранных липидах (в особенности линолевой ($C_{18:2}$) и линоленовой ($C_{18:3}$) кислот), а также повышенным ИН и содержанием общего количества ЖК. Такие изменения в липидном бислое мембран сопровождались снижением интенсивности процессов ОС и ПОЛ в клетках вегетирующих растений (незакаленных) после действия повреждающей, но не вызывающей льдообразования температуры, а также повышением конститутивной устойчивости вегетирующих растений к гипотермии. При этом почти неизученным оставался вопрос об изменении липидного метаболизма при формировании устойчивости холодостойких растений в условиях длительного низкотемпературного закалывания и об участии в этом процессе $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы, осуществляющей образование второй двойной связи в ацильных цепях ЖК и являющейся критическим ферментом, необходимым для выживания цианобактерий [10], и, возможно, растений, при низких температурах. Корреляцию между активностью десатураз и устойчивостью к холоду у растений наблюдали при использовании мутантов с “выключенными” генами десатураз (*FAD* – fatty acid desaturase) [11]. Так, проростки *A. thaliana* с выключенным геном *FAD2*, неспособные к синтезу диеновых ЖК в ЭПР при холодной экспозиции (6°C в течение 42 дней), которая не является повреждающей для исходного экотипа, погибали. 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 сокращалось содержание диеновых и триеновых ЖК в галактолипидах хлоропластов и наблюдалось снижение устойчивости к низкой температуре.

В связи с этим, цель настоящей работы состояла в изучении изменений в содержании отдельных видов ЖК в мембранных липидах холодостойких растений (на примере картофеля) в процессе их закалывания при низкой температуре, приводящей к повышению устойчивости к действию заморозков, а также в выявлении роли $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы в этих процессах. В частности, с использованием трансформированных растений, отличающихся повышенным конститутивным содержанием ПНЖК, выясняли, происходят ли у них во время закалывания дополнительные изме-

нения в составе и содержании ЖК мембранных липидов, степени их ненасыщенности и, как следствие, устойчивости к гипотермии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили нетрансформированные растения (контроль) типичного представителя группы холодостойких растений — картофеля клубненосного (*Solanum tuberosum* L., сорт Десница) и трансформированные конструкцией, несущей ген *desA* Δ 12-ацил-липидной десатуразы цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803, мембраны которой, согласно ранее полученным данным, были обогащены липидами с повышенным содержанием ПНЖК [9, 12]. В данной конструкции последовательность гена десатуразы была трансляционно слита с последовательностью репортерного гена *licBM3*, кодирующего термостабильную лихеназу (далее *desA-licBM3* растения). Наличие и экспрессия введенного гена *desA* Δ 12-ацил-липидной десатуразы в *desA-licBM3* растениях были подтверждены методом ПЦР, в том числе с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), т.е. по образованию матричной РНК [12].

Растения выращивали в течение 8 нед. на минеральной среде “перлит” с периодической подкормкой минеральным удобрением “Кемира-Люкс” при температуре 22°C и 16-часовом фотопериоде с освещенностью 100 мкмоль квантов/(м² с). Закаливание проводили при температуре 5°C в течение 6 сут, согласно нашим предыдущим работам [6]. Изменения в устойчивости растений картофеля после закаливания определяли, воздействуя на них повреждающей температурой –3°C в течение 18 ч, а также регистрировали измерения электропроводности экстракта из клеток листьев [13]. Устойчивость оценивали по величине обратной максимальной выходу электролитов, по формуле:

$$H (\%) = 100 - E_L, \quad (1)$$

где H — устойчивость, E_L — максимальный выход электролитов, $E_L (\%) = 100(E_{\text{охл}} - E_{\text{исх}})/(E_{\text{кип}} - E_{\text{исх}})$, $L_{\text{исх}}$ — выход электролитов до воздействия, $L_{\text{охл}}$ — выход электролитов после охлаждения, $L_{\text{кип}}$ — выход электролитов после кипячения, соответственно.

Определение качественного состава и абсолютного содержания ЖК общих липидов проводили методом ГЖХ их метиловых эфиров (МЭЖК) [14, 15]. С целью получения последних к листьям (5 г) добавляли 50 мл изопропанола, 0.5 мл 0.001% изопропанольного раствора ионола в качестве антиоксиданта, а также 4 мл изопропанольного раствора маргаритовой кислоты ($C_{17:0}$, 98 мкг/мл) в качестве внутреннего стандарта. Смесь гомогенизировали, добавляли в нее 2 г КОН и омыляли в течение 60 мин при температуре кипения. Спирт отгоняли и замещали водой; неомыляемые ком-

поненты препарата отделяли гексаном. Оставшийся водно-щелочной раствор нейтрализовали до pH 2 20% раствором серной кислоты. Образовавшиеся свободные ЖК экстрагировали гексаном. Метилирование ЖК проводили путем их каталитической этерификации при температуре кипения в смеси 10 мл CH_3OH и 0.5 мл CH_3COCl в течение 1 ч, как описано ранее [9]. Полученные МЭЖК 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 Aligent 7890A GC (США). Массивы данных площадей индивидуальных видов МЭЖК были обработаны с помощью пакета программ Excel.

Для оценки ненасыщенности ЖК в липидах использовали индекс ненасыщенности:

$$ИН = \sum P_{ij} e_i / 100, \quad (2)$$

где P_i — содержание i -той ЖК (%), e_i — число двойных (олефиновых) связей в i -той ЖК [4]. Расчетная активность ацил-липидных Δ 9-, Δ 12- и ω 3-десатураз, катализирующих введение двойных связей в алифатические углеродные цепи олеиновой ($C_{18:1}$), линолевой ($C_{18:2}$) и линоленовой ($C_{18:3}$) кислот ЖК, определялась как стеариол (SDR)-, олеил (ODR)- и линолеил (LDR)-десатуразные отношения, рассчитанные на основании содержания отдельных компонентов суммы C_{18} -ЖК [16]:

$$SDR = (C_{18:1}) / (C_{18:0} + C_{18:1}), \quad (3)$$

$$ODR = (C_{18:2} + C_{18:3}) / (C_{18:1} + C_{18:2} + C_{18:3}), \quad (4)$$

$$LDR = (C_{18:3}) / (C_{18:3} + C_{18:2}), \quad (5)$$

где $C_{18:0}$, $C_{18:1}$, $C_{18:2}$ и $C_{18:3}$ — процентное от суммы ЖК содержание стеариновой, олеиновой, линолевой и линоленовой кислот, соответственно.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Стьюдента. Обсуждаются различия между экспериментальными данными, достоверно значимые при $P \leq 0.05$. Результаты в таблицах (кроме табл. 3) представлены как средние арифметические значения опыта из трех биологических и аналитических повторностей и их стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что устойчивость растений к гипотермии формируется в процессе длительного 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, прежде чем приступить к решению поставленных в работе задач, необходимо было убедиться, что

Таблица 1. Выход электролитов (% от полного) из тканей листьев незакаленных и закаленных контрольных и *desA-licBM3* растений картофеля после действия повреждающих температур

Вариант опыта		Температура/Продолжительность действия			
		0°C/24 ч	-2°C/24 ч	-3°C/18 ч	-3°C/24 ч
Незакаленные	Контрольные растения	5.0 ± 1.5	84.2 ± 3.3 ^a	73.7 ± 3.1 ^a	97.6 ± 0.8
	<i>desA-licBM3</i> растения	3.4 ± 0.9	76.5 ± 6.8 ^b	84.5 ± 3.9 ^b	94.5 ± 2.6
Закаленные	Контрольные растения	3.6 ± 1.1	26.7 ± 4.6 ^{ac}	61.0 ± 4.3 ^{ac}	90.3 ± 3.1
	<i>desA-licBM3</i> растения	6.9 ± 1.6	13.4 ± 5.2 ^{bc}	44.8 ± 4.7 ^{bc}	83.8 ± 3.9

Примечание. Результаты представлены как средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Разными латинскими буквами обозначены значимые различия между средними значениями вариантов при $P \leq 0.05$.

закаливание используемых нами растений картофеля при 5°C в течение 6 сут приводило к повышению их устойчивости к продолжительному действию заморозков. Для этого нами был применен метод прямого промораживания незакаленных и закаленных растений обоих генотипов с последующим измерением выхода электролитов из клеток после повреждающего (но не губительного) действия отрицательной температуры, что позволяет оценить степень их повреждения, которая является величиной, обратной выходу электролитов. Температуры с разной длительностью воздействия подбирали в диапазоне от 0 до -3°C.

Как видно из таблицы 1, при действии температуры 0°C в течение 24 ч, ни у контрольных, ни у *desA-licBM3* растений как в незакаленном, так и в закаленном состоянии различий в выходе электролитов из клеток не выявлено. Снижение температуры до -2°C сопровождалось заметным повышением выхода электролитов из листьев незакаленных как контрольных, так и *desA-licBM3* растений (~80%), но после закаливания оба генотипа выживали практически во всех вариантах опыта, выход электролитов из их тканей составлял от 10 до 30%. Это свидетельствует об отсутствии существенных повреждений мембран, и, что очень важно, указывает на способность растений картофеля повышать устойчивость к заморозкам в условиях низкотемпературного закаливания. Для получения более значимых различий между закаленными и незакаленными растениями обоих генотипов было применено более жесткое воздействие температурой (-3°C, 24 ч), которое привело к их замерзанию и практически полному выходу электролитов (выше 90%) из растений всех вариантов опыта и, как следствие, к их гибели, в связи с чем время воздействия температуры -3°C было снижено до 18 ч. Эта экспозиция вызывала гибель обоих генотипов картофеля в незакаленном состоянии, у которых был обнаружен более чем 75% выход электролитов, однако закаленные растения по-

вреждались лишь частично. Так, выход электролитов из тканей закаленных трансформированных растений составил 45%, что свидетельствует о меньшем повреждении их мембран, по сравнению с закаленными контрольными растениями, у которых выход электролитов достигал 60%. По-видимому, трансформированные растения обладали способностью оставаться во время заморозка в переохлажденном состоянии более длительное время. Таким образом, именно воздействие температурой -3°C в течение 18 ч было наиболее подходящим при оценке устойчивости к заморозкам закаленных растений картофеля обоих генотипов. Следует отметить, что контрольные растения картофеля в процессе закаливания также повышали устойчивость к заморозку (-2°C), который они выдерживали практически без повреждений в течение суток, тогда как контрольные растения в незакаленном состоянии полностью погибали после такой температурной экспозиции (рис. 1).

В связи с этим, как у контрольных, так и у трансформированных растений картофеля был изучен качественный состав и абсолютное содержание этерифицированных ЖК клеток в процессе низкотемпературного закаливания.

Как видно из табл. 2, вегетирующие растения картофеля, экспрессирующие ген цианобактериальной $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы, уже до закаливания имели большее, по сравнению с контролем, количество мембранных липидов с преимущественным содержанием ПНЖК в их составе. Трансформация приводила к увеличению абсолютного содержания мембранных липидов примерно на 20%, с преобладанием в их составе линолевой ($C_{18:2}$) и линоленовой ($C_{18:3}$) кислот. Содержание моноеновых ($C_{16:1}$ и $C_{18:1}$) кислот у трансформантов также было выше, чем в контроле, на 30 и 45%, соответственно. По-видимому, трансформированные растения имели дополнительный субстрат в виде олеиновой кислоты для образования $C_{18:2}$ линолевой кислоты за счет увеличения

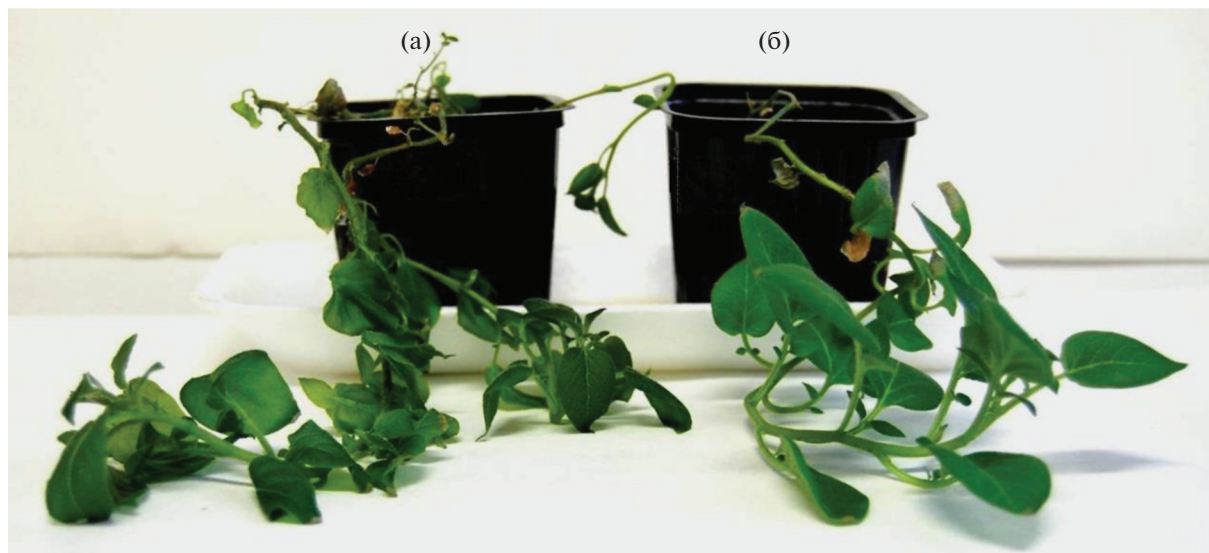


Рис. 1. Внешний вид незакаленных (а) и закаленных (б) контрольных растений картофеля после действия повреждающей температуры -2°C в течение 24 ч.

активности собственных $\Delta 9$ -десатураз картофеля, превращающих $\text{C}_{18:0}$ стеарат в $\text{C}_{18:1}$ олеат.

Как показано в таблице 2, в процессе закаливания в листьях контрольных растений происходило повышение содержания общей суммы ЖК почти на 25%. Эти изменения включали увеличе-

ние содержания как насыщенных (~ на 10%), так и ненасыщенных ЖК (~ на 30%), в том числе за счет одинакового повышения доли $\text{C}_{18:2}$ линолевой и $\text{C}_{18:3}$ линоленовой кислот ЖК примерно на 30%. В результате такого повышения, концентрация этих двух ЖК составила почти 70% от общей

Таблица 2. Содержание главных ЖК в листьях контрольных и трансформированных геном *desA* $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы растений картофеля до (1) и после (2) низкотемпературного закаливания

ЖК	Содержание ЖК							
	Контроль				<i>desA-licBM3</i> растения			
	мкг/г сырой массы	масс %	мкг/г сырой массы	масс %	мкг/г сырой массы	масс %	мкг/г сырой массы	масс %
	1	1	2	2	1	1	2	2
14:0	19 ± 2	0.5	14 ± 1	0.3	15 ± 1	0.3	20 ± 2	0.4
15:0	14 ± 1	0.4	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
16:0	758 ± 24 ^{ad}	19.9	821 ± 43 ^a	17.1	839 ± 43 ^d	20.6	885 ± 47	18.6
Z-16:1c	100 ± 7 ^d	2.6	101 ± 9	2.1	145 ± 11 ^{bd}	2.8	89 ± 5 ^b	1.9
Z,Z-16:2c,c	17 ± 3	0.5	13 ± 2	0.3	19 ± 3	0.4	18 ± 2	0.4
Z,Z,Z-16:3c,c,c	100 ± 4 ^a	2.6	138 ± 6 ^{ac}	2.9	103 ± 7 ^b	2.2	188 ± 14 ^{bc}	3.9
18:0	88 ± 5 ^{ad}	2.3	121 ± 8 ^a	2.5	123 ± 15 ^d	2.7	111 ± 9	2.3
Z-18:1c	83 ± 3 ^{ad}	2.2	221 ± 12 ^{ac}	4.6	107 ± 8 ^d	2.3	136 ± 11 ^c	2.9
Z,Z-18:2c,c	605 ± 25 ^{ad}	15.9	790 ± 37 ^a	16.4	736 ± 18 ^{bd}	16.3	823 ± 36 ^b	17.3
Z,Z,Z-18:3c,c,c	1962 ± 127 ^{ad}	51.5	2515 ± 184 ^a	52.3	2361 ± 132 ^d	51.7	2422 ± 124	51.0
20:0	43 ± 8	1.1	65 ± 12	1.4	57 ± 11	1.2	41 ± 8	0.9
Сумма НЖК	922	24.2	1021	21.3	1034	23.4	1057	22.2
Сумма ПНЖК	2867	75.8	3778	78.7	3475	76.6	3676	77.8
Сумма ЖК	3789	100	4799	100	4509	100	4733	100
ИН	2.01		2.05		2.01		2.07	

Примечание. Z – обозначение цис-олефиновой связи в молекулах ненасыщенных ЖК. Результаты представлены как средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Разными латинскими буквами обозначены значимые различия между средними значениями вариантов при $P \leq 0.05$.

Таблица 3. Показатели расчетных индексов, отражающих активность $\Delta 9$ - (SDR), $\Delta 12$ - (ODR) и $\Delta 15(\omega 3)$ - (LDR) десатураз после действия закалывающей температуры (5°C , в течение 6 сут) у контрольных и трансформированных растений картофеля

Расчетный индекс десатуразной активности	Контроль		<i>desA-licBM3</i> растения	
	до закалывания	после закалывания	до закалывания	после закалывания
SDR(стеароил)-	0.48	0.65	0.60	0.55
ODR(олеоил)-	0.97	0.94	0.94	0.96
LDR(линолеоил)-	0.77	0.76	0.79	0.75

суммы ЖК с преимущественным содержанием $\text{C}_{18:3}$ линоленовой кислоты. Изменение соотношения насыщенных и ненасыщенных ЖК при действии холода и роль ПНЖК в формировании устойчивости в процессе закалывания морозостойких растений были неоднократно описаны в литературе. Так, в листьях различных генотипов пшеницы в условиях холодого закалывания при 4°C снижалось содержание насыщенных $\text{C}_{16:0}$ и $\text{C}_{18:0}$ ЖК, тогда как содержание ненасыщенных $\text{C}_{18:2}$ и $\text{C}_{18:3}$ линолевой и линоленовой ЖК возрастало [17].

На основании полученных нами данных были рассчитаны индексы активности $\Delta 9$ -, $\Delta 12$ - и $\Delta 15(\omega 3)$ -десатураз, участвующих в образовании $\text{C}_{18:1}$, $\text{C}_{18:2}$, $\text{C}_{18:3}$ кислот, соответственно. Так, у контрольных растений картофеля во время закалывания (табл. 3) выявлено существенное увеличение активности $\Delta 9$ -десатураз (SDR повысился с 0.45 до 0.65). Это подтверждается данными литературы, согласно которым при низкотемпературном закалывании у холодостойких растений *A. thaliana* [18, 19] происходила индукция гена *ADS* $\Delta 9$ -ацил-липидной десатуразы. Согласно нашим данным и данным литературы, повышение активности $\Delta 9$ -десатураз, по-видимому, объясняется необходимостью образования первой двойной связи для обеспечения субстратами последующих десатураз. Что же касается рассчитанных нами активностей $\Delta 12$ - и $\Delta 15(\omega)$ -десатураз во время закалывания картофеля, то они оставались практически без изменений, хотя в литературе имеются данные об увеличении уровня экспрессии гена *FAD6* $\Delta 12$ -десатуразы хлоропластной локализации, участвующей в образовании $\text{C}_{18:2}$ линолевой кислоты в первые часы холодого закалывания картофеля [20].

Таким образом, согласно полученным нами результатам, мембраны клеток листьев картофеля в процессе закалывания обогащаются ЖК, в том числе и ПНЖК, что согласуется с данными по повышению устойчивости этих растений к заморозкам (табл. 1) и окислительному стрессу [6]. В работе Лавровой с соавт. [16] при закалывании картофеля в условиях длительного действия низкой

температуры также показано увеличение ненасыщенности ЖК липидов за счет диеновых и триеновых ЖК, а при кратковременном действии холода наблюдалось повышение только триеновых ЖК и, соответственно активности $\omega 3$ -десатураз. У проростков морозостойкой пшеницы в результате закалывания на свету наблюдалось преимущественное повышение содержания линоленовой ЖК [21], что свидетельствует о ее важной роли в формировании устойчивости растений к морозу.

Рассматривая изменения в качественном составе и абсолютном содержании индивидуальных видов этерифицированных ЖК общих липидов при закалывании трансформированных растений, особенно важно отметить, что уже до закалывания они были обогащены липидами в такой же степени, как контрольные растения после закалывания. Их расчетный индекс активности $\Delta 9$ -десатураз (табл. 3) был выше, по сравнению с незакаленным контролем (0.60 и 0.48, соответственно). Кроме того, в соответствии с более высоким общим содержанием ЖК мембранных липидов, трансформанты к началу закалывания обладали большим числом тилакоидов [22], чем контрольные растения (у контрольных растений – 86, а у трансформантов – 154). Такое количество тилакоидов у контрольных растений наблюдали только после закалывания. Следовательно, состав и содержание ЖК липидов мембран контрольных и трансформированных растений к началу закалывания существенно различался, что в значительной степени определило дальнейший ход процессов закалывания трансформантов при низкой температуре [9]. При этом, совместное влияние трансформации и действия закалывающих температур на состав и содержание ЖК мембранных липидов ранее практически не изучалось.

Поскольку трансформанты к началу закалывания обладали более высоким содержанием ЖК, в процессе их закалывания повышение общей суммы ЖК происходило в меньшей степени, по сравнению с контролем. Если у контрольных растений во время закалывания накапливались как насыщенные, так и ПНЖК, то у трансформантов содержание насыщенных ЖК даже несколько снижалось, а повышалось лишь содержание

ПНЖК. Так, количество $C_{18:2}$ линолевой кислоты у трансформанта возрастало на 10%, гексадекатриеновой ($C_{16:3}$) кислоты – на 80% (то есть в 2 раза больше, чем в контроле). Повышение содержания $C_{16:3}$ гексадекатриеновой кислоты, вероятно, происходило в результате активации низкой температурой собственных $\omega 3$ -десатураз картофеля. Из литературных данных известно, что у трансформированного томата при сверхэкспрессии генов десатураз *FAD3* и *FAD7*, которые катализируют превращение линолевой в линоленовую кислоту, изменялся ЖК-состав общих липидов, что сопровождалось повышением устойчивости к охлаждению. Авторы предполагают существование отдельного пула $C_{18:3}$ линоленовой кислоты для обеспечения выживания растений в неблагоприятных условиях [21, 23]. В работе De Palma [24] картофель *Solanum tuberosum*, который трансформировали $\Delta 9$ -десатуразой устойчивого к холоду *S. commersonii*, после закаливания также проявлял более высокую устойчивость к низкой температуре. Эти литературные данные указывают на то, что дополнительная десатурация ЖК (повышение активности $\Delta 9$ - и $\Delta 15(\omega 3)$ -десатураз) мембранных липидов приводит к увеличению уровня устойчивости растений к холоду.

Как было упомянуто ранее, в образовании диеновых ЖК у растений участвуют $\Delta 12$ -десатуразы *FAD6* в хлоропластах и семейство $\Delta 12$ -десатураз *FAD2* в ЭПР, однако необходимо подчеркнуть, что они изучались, в основном, у теплолюбивых растений [25]. Тогда как при выращивании холодостойких растений арабидопсиса при низких температурах, по сравнению с контролем, не было обнаружено значительных различий в уровнях экспрессии генов *FAD2* и *FAD6* [26]. Однако позже было показано, что мутанты арабидопсиса по гену *FAD6* отличались высоким содержанием мононенасыщенных ЖК и пониженным содержанием ПНЖК в мембранных липидах [11] и были более чувствительны к низкотемпературным повреждениям по сравнению с растениями дикого типа. Это подтверждается и в работах других авторов [27], где показано, что мутанты арабидопсиса при “выключении” гена *FAD2* были неспособны регулировать текучесть плазмалеммы при смене циклов тепло/холод (12 ч 27°C/12 ч 12°C), по сравнению с проростками дикого типа.

Таким образом, на основании полученных нами данных можно сделать заключение, что в процессе низкотемпературного закаливания в листьях контрольных растений картофеля происходит накопление суммы ЖК мембранных липидов примерно на 25% преимущественно за счет накопления ПНЖК. По-видимому, это происходит за счет активации закаливающей температурой липидного метаболизма в целом, и, в частности, ферментов-десатураз, что приводит к более стабильному

функционированию мембранных структур клетки и предотвращению частичного сброса электронов на кислород с образованием АФК [5, 6]. Следует отметить, что мембраны, богатые ПНЖК, в последнее время рассматриваются в качестве супрамолекулярных антиоксидантов. Их окисление может служить механизмом защиты от АФК других, более важных макромолекул [28].

Трансформанты, еще до закаливания обогащенные ПНЖК в такой же степени как закаленные контрольные растения, в процессе закаливания продолжали повышать содержание ненасыщенных $C_{18:2}$ линолевой и $C_{16:3}$ ЖК гексадекатриеновой кислоты. Это, по-видимому, обеспечивало им более благоприятное прохождение процессов закаливания. Так, согласно полученным нами ранее данным трансформанты отличались более интенсивным синтезом сахаров в начале закаливания [21], низким уровнем H_2O_2 и МДА, повышенной активностью антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы и каталазы [5], что в итоге привело к повышению их устойчивости к более продолжительному действию заморозков. Это свидетельствует о важной роли $\Delta 12$ ацил-липидной десатуразы при закаливании растений к низкой температуре.

Авторы выражают благодарность А.М. Носову и И.В. Голденковой-Павловой (Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева) за предоставленный для исследования материал.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект 16-34-00604 мол_a).

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Титов А.Ф., Акимова Т.В., Таланова В.В., Топчиева Л.В. Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур. Москва: Наука, 2006. 143 с.
2. Трунова Т.И. Растение и низкотемпературный стресс. 64-е Тимирязевское чтение. М.: Наука, 2007. 54 с.
3. John R., Anjum N.A., Sopory S.K., Akram N.A., Ashraf M. Some key physiological and molecular processes of cold acclimation // Biol. Plant. 2016. V. 60. P. 603.
4. Lyons J.M. Chilling injury in plants // Annu. Rev. Plant. Physiol. 1973. V. 24. P. 445.
5. Нарайкина Н.В., Синькевич М.С., Дёмин И.Н., Селиванов А.А., Мошков И.Е., Трунова Т.И. Изменения активности изоформ супероксиддисмутазы у растений картофеля дикого типа и трансформированных геном $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы при низкотемпературной адаптации // Физиология растений. 2014. Т. 61. С. 359.

6. Нарайкина Н.В., Синькевич М.С., Дерябин А.Н., Трунова Т.И. Активность нейтрализующих пероксид водорода ферментов при низкотемпературном закаливании растений картофеля, трансформированного геном *desA* Δ 12-ацил-липидной десатуразы // Физиология растений. 2018. Т. 65. С. 340.
7. Лось Д.А. Десатуразы жирных кислот. Москва: Научный мир, 2014. 372 с.
8. Сидоров Р.А., Цыдендамбаев В.Д. Биосинтез жирных масел у высших растений // Физиология растений. 2014. Т. 61. С. 3.
9. Дёмин И.Н., Нарайкина Н.В., Цыдендамбаев В.Д., Мошков И.Е., Трунова Т.И. Влияние трансформации растений картофеля геном Δ 12-ацил-липидной десатуразы на CO_2 -газообмен и активность антиоксидантных ферментов при гипотермии // Физиология растений. 2013. Т. 60. С. 377.
10. Лось Д.А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот // Успехи биологической химии. 2001. Т. 41. С. 163.
11. Iba K. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance // Ann. Rev. Plant Biol. 2002. V. 53. P. 225.
12. Demin I.N., Shimshilashvili C.R., Yur'eva N.O., Naraykina N.V., Goldenkova-Pavlova I.V., Los D.A., Nosov A.M., Trunova T.I. Overexpression of the acyl-lipid Δ 12-desaturase gene protects potato plants from low temperature damage // Acta Agron. 2011. V. 59. P. 87.
13. Hepburn H.A., Nayllor F.L., Strokes D.I. Electrolyte leakage from winter barley tissue as indicator of winter hardiness // Ann. Appl. Biol. 1986. V. 108. P. 164.
14. Цыдендамбаев В.Д., Верецагин А.Г. Исследование липидов корня сахарной свеклы в связи с функцией сахаронакопления // Физиология растений. 1980. Т. 27. С. 778.
15. Пчелкин В.П., Кузнецова Э.И., Цыдендамбаев В.Д., Верецагин А.Г. Определение позиционно-видового состава запасных триацилглицеринов растений методом неполного химического деацилирования // Физиология растений. 2001. Т. 48. С. 809.
16. 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.
17. NejadSadeghi L., Maali-Amiri R., Zeinali H., Ramezanzadeh S., Sadeghzade B. Membrane fatty acid compositions and cold-cold induced responses in tetraploid and hexaploid wheats // Mol. Biol. Rep. 2015. V. 42. P. 363.
18. Kreps J.A., Wu Y., Chang H.S., Zhu T., Wang X., Harper J.F. Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress // Plant Physiol. 2002. V. 130. P. 2129.
19. Селиванов А.А., Попов В.Н., Антипина О.В., Пчелкин 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. 228.
20. 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. V. 177. P. 792.
21. Верецагин А.Г. Липиды в жизни растений. 66-е Тимирязевское чтение. Москва: Наука, 2007, 78 с.
22. 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 Δ 12-ацил-липидной десатуразы // Известия РАН. Серия Биологическая. 2018. № 6. 635.
23. Dominguez T., Hernandez M.L., Pennycooke J.C., Jimenez P., Martinez-Rivas J.M., Sanz C., Stockinger E.J., Sanchez-Serrano J.J., Sanmartin M. Increasing ω -3 desaturase expression in tomato results in altered aroma profile and enhanced resistance to cold stress // Plant Physiol. 2010. V. 153. P. 655.
24. De Palma M., Grillo S., Massarelli I., Costa A., Balogh G., Vigh L., Leone A. Regulation of desaturase gene expression, changes in membrane lipid composition and freezing tolerance in potato plants // Mol. Breeding. 2008. V. 21. P. 15.
25. Dar A.A., Choudhury A.R., Kancharla P.K., Arumugam N. The *FAD2* gene in plants: occurrence, regulation, and role // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. P. 1.
26. Okuley J., Lightner J., Feldmann K., Yadav N., Lark E., Browse J. Arabidopsis *FAD2* gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis // Plant Cell. 1994. V. 6. P. 147.
27. Martiniere A., Shvedunova M., Thomson A.J., Evans N.H., Penfield S., Runions J., McWatters H.G. Homeostasis of plasma membrane viscosity in fluctuating temperatures // New Phytol. 2011. V. 192. P. 328.
28. Schmid-Siegert E., Stepushenko O., Glauser G., Farmer E.E. Recycling of malondialdehyde to its source in oxidation-sensitive chloroplast fatty acids // J. Biol. Chem. 2016. V. 291. P. 13005.