

На правах рукописи

РЕПКИНА Наталья Сергеевна

**ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
МЕХАНИЗМОВ АДАПТАЦИИ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ
К РАЗДЕЛЬНОМУ И СОВМЕСТНОМУ ДЕЙСТВИЮ
НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ И КАДМИЯ**

03.02.08 – экология

03.01.05 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Петрозаводск – 2014

Работа выполнена в лаборатории экологической физиологии растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии Карельского научного центра Российской академии наук

Научный руководитель

доктор биологических наук
Таланова Вера Викторовна

Официальные оппоненты:

Шакирова Фарида Миннихановна
доктор биологических наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, заведующий отделом молекулярной биологии и физиологии растений

Теребова Елена Николаевна
кандидат биологических наук, доцент,
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Петрозаводский государственный университет, доцент кафедры ботаники и физиологии растений

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт экологии Волжского бассейна Российской академии наук

Защита диссертации состоится 2 апреля 2014 г. в 14.00 в ауд.117 на заседании диссертационного совета Д 212.190.01 при Петрозаводском государственном университете по адресу: 185910, Республика Карелия, г. Петрозаводск, ул. Красноармейская, 31, эколого-биологический факультет, тел.факс: 8(8142)763864.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте www.petrso.ru Петрозаводского государственного университета, с авторефератом – на сайте <http://vak.ed.gov.ru> и www.petrso.ru.

Автореферат разослан «__» февраля 2014 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
канд.биол.наук



Дзюбук И. М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Во многих регионах мира дефицит тепла, обусловленный низкими температурами воздуха и почвы, выступает главным фактором, лимитирующим рост, развитие и продуктивность растений (Туманов, 1979; Дроздов и др., 1984; Коровин, 1984; Xin, Browse, 2000; Sung et al., 2003; Трунова, 2007; Колупаев, Карпец, 2010; Войников, 2013). В последние годы к неблагоприятным природно-климатическим факторам добавляется возрастающее техногенное воздействие на биосферу, которое обуславливает загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами, в том числе и высокотоксичным для всех живых организмов кадмием (Титов и др., 2007; Лукаткин, Башмаков, 2009). Поэтому сохранение жизнеспособности растений в этих условиях требует мобилизации всех имеющихся у них адаптивных механизмов.

Как показывают исследования, растения обладают целым комплексом адаптационных механизмов, которые реализуются на разных уровнях организации – от молекулярного до организменного, в том числе связанных с индукцией экспрессии большого числа генов и синтеза соответствующих белков (Levitt, 1980; Шакирова, 2001; Чиркова, 2002; Yamaguchi-Shinozaki, Shinozaki, 2006; Ouellet, 2007; Guy et al., 2008; Кошкин, 2010; Theocharis et al., 2012). Некоторые из этих механизмов специфичны в отношении того или иного воздействующего фактора, в то время как другие являются общими (неспецифичными) для разных факторов. Последнее обуславливает способность растений при действии одного неблагоприятного фактора повышать устойчивость к факторам иной природы (явление кросс-адаптации) (Титов и др., 1983; Кузнецов и др., 1990; Gong et al., 2001; Guang, Gong, 2011; Радюкина и др., 2012). Однако, механизмы кросс-адаптации остаются все еще не ясными.

Необходимо отметить, что в большинстве случаев исследователи изучают механизмы адаптации растений к действию одного конкретного неблагоприятного фактора, а работы, посвященные изучению комбинированного (совместного или последовательного) действия факторов разной природы на растения пока единичны (Гармаш, Головкин, 2009; Hu et al., 2010; Iqbal, Ashraf, 2010; Grigорова et al., 2011; Al-Issawi et al., 2013). В природных же условиях неблагоприятные факторы действуют на растения, как правило, одновременно, а их ответные реакции на совместное действие факторов, в том числе низких температур и тяжелых металлов, могут заметно отличаться от эффектов, вызываемых действием каждого из них. Однако, работы, направленные на изучение механизмов их совместного действия на растения, в известной нам литературе отсутствуют.

Учитывая это, исследование механизмов адаптации растений (на организменном и клеточном уровне) не только к отдельному, но и совместному действию низкой температуры и тяжелых металлов является весьма актуальным.

Цель и задачи исследования. Цель работы заключалась в исследовании ряда эколого-физиологических механизмов адаптации растений пшеницы к отдельному и совместному действию низкой температуры и кадмия.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Оценить реакцию растений пшеницы на действие низкой температуры, кадмия и их совместное действие по ряду физиолого-биохимических показателей (биометрические показатели, холодоустойчивость, проницаемость мембран).

2. Охарактеризовать динамику накопления транскриптов генов транскрипционных факторов в листьях растений пшеницы при отдельном и совместном действии низкой температуры и кадмия.

3. Выявить особенности накопления транскриптов генов, кодирующих COR/LEA белки и протеолитические ферменты, в листьях растений пшеницы при отдельном и совместном действии низкой температуры и кадмия.

4. Оценить роль непротеиновых тиолов (глутатиона и фитохелатинов) в механизмах адаптации растений пшеницы к отдельному и совместному действию низкой температуры и кадмия.

5. Исследовать роль низкомолекулярного осмопротектора и антиоксиданта – свободного пролина – в процессах адаптации растений к отдельному и совместному действию низкой температуры и кадмия.

Научная новизна работы. Впервые показано, что повышение холодоустойчивости растений пшеницы происходит не только при низкой закалывающей температуре, но и под влиянием кадмия, хотя и в меньшей степени. Впервые обнаружено, что накопление транскриптов генов транскрипционных факторов (*CBF1*, *DREB1*, *MYB80*), АТФ-зависимых протеолитических ферментов (*Lon1*, *ClpP*), LEA белков (*WCOR15*, *WRAB15*, *WRAB18*, *WDHN13*) происходит как при отдельном, так и совместном действии низкой температуры и кадмия. В отличие от этого, аккумуляция мРНК COR гена *WCS120* более характерна для реакции растений пшеницы на воздействие низкой температуры. Впервые полученные данные о повышении содержания низкомолекулярных антиоксидантов (глутатиона и свободного пролина) и фитохелатинов, а также о накоплении транскриптов генов, кодирующих ферменты их синтеза (*GSI*, *WP5CS*, *PCSI*) не только при отдельном, но и совместном действии низкой температуры и кадмия в листьях растений пшеницы, указывают на их участие в механизмах адаптации к действию этих неблагоприятных факторов.

Практическая значимость работы. Полученные данные углубляют и расширяют имеющиеся в настоящее время представления об участии генов и белков транскрипционных факторов, COR/LEA белков, протеиназ, ферментов синтеза пролина, глутатиона и его производных в механизмах адаптации растений к отдельному и совместному действию низких температур и кадмия. Полученные сведения могут быть использованы при организации дальнейших физиолого-биохимических и молекулярно-генетических исследований устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды. Результаты исследований могут быть использованы при чтении ряда спецкурсов для студентов экологических, физиологических, биохимических специальностей. Полученные данные включены в учебное пособие "Устойчивость растений к действию тяжелых металлов и экспрессия генов".

Личный вклад автора в получении научных результатов. Автор лично принимал участие в планировании и проведении экспериментов, в статистической обработке и интерпретации полученных результатов, а также в написании статей, опубликованных по результатам работы.

Связь работы с научными программами. Исследования проводились с 2011 по 2013 гг. в соответствии с планом НИР ИБ КарНЦ РАН, являясь частью плановой темы "Физиолого-биохимические и молекулярно-генетические механизмы реакции растений на действие неблагоприятных температур и тяжелых металлов" (№ гос. рег. 01201166444), при поддержке грантов РФФИ № 10-04-00650-а и ФЦП "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" на 2009-2013 гг. № соглашений 8050 и 14.21.132.1321.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы доложены на VII съезде Общества физиологов растений России "Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий" (Нижний Новгород, 2011); V и VI Российском симпозиумах "Белки и пептиды" (Петрозаводск, 2011; Уфа, 2013); VII-ой международной научной конференции "Регуляция роста, развития и продуктивности растений" (Белоруссия, Минск, 2011); Всероссийском симпозиуме "Экология мегаполисов: фундаментальные основы и инновационные технологии" (Москва, 2011); XIX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов–2012" (Москва, 2012); Междисциплинарной научной конференции "Адаптационные стратегии живых систем" (Украина, Новый Свет, 2012); 3-м Международном симпозиуме "Intracellular Signaling and Bioactive Molecules Design" (Украина, Львов, 2012); II (X) Международной ботанической конференции молодых ученых (Санкт-Петербург, 2012); 17-й Международной Пуцинской школы-конференции молодых ученых "Биология – наука XXI века" (Пушино, 2013); Всероссийской научной конференции "Инновационные направления современной физиологии растений" (Москва, 2013); XIII съезде Российского ботанического общества (Тольятти, 2013).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 19 работ, из них 5 статей – в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения и обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы, включающего 352 наименований, в том числе 248 на иностранном языке. Работа изложена на 158 страницах, содержит 23 рисунка и 10 таблиц.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве модельного объекта исследований использовали растения озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39 на ранних этапах развития.

Растения выращивали в рулонах фильтровальной бумаги на питательном растворе (рН 6,2–6,4) с добавлением микроэлементов в климатических камерах при температуре воздуха 22°C, его относительной влажности 60–70%, освещенности 10 клк и 14-часовом фотопериоде. По достижении недельного возраста растения пшеницы подвергали действию низкой закалывающей температуры (4°C) или сульфата кадмия (100 мкМ), а также их совместному действию, сохраняя прочие условия неизменными. Продолжительность воздействия составляла от 15 мин до 7 сут. В специальном опыте проростки пшеницы подвергали действию температур 4–12 °С или сульфата кадмия в концентрациях 100–2000 мкМ в течение 7 сут.

Для измерения биометрических показателей использовали общепринятые методы.

Устойчивость растений к действию низких температур оценивали по реакции клеток высечек из листьев на 5-минутное тестирующее промораживание в термоэлектрическом микрохолодильнике ТЖР-02/-20 («Интерм», Россия) при последовательном изменении температуры с интервалом 0,4° (Балагурова и др., 1982). В качестве критерия устойчивости использовали температуру гибели 50% паренхимных клеток (LT_{50}), определяемую по деструкции хлоропластов и коагуляции цитоплазмы.

Проницаемость мембран клеток при воздействии низкой температуры, сульфата кадмия и их совместном действии оценивали по выходу электролитов из высечек листьев пшеницы (Гришенкова, Лукаткин, 2007) с использованием кондуктометра («HANNA», Италия).

Содержание кадмия в корнях и листьях растений анализировали методом инверсионной вольтамперометрии с использованием полярографа АВС-1.1 (Вольта, Россия). Разложение растительных образцов проводили в смеси HNO_3 и H_2O_2 в соотношении 4:1 с использованием микроволновой системы пробоподготовки МС-6 («Вольта», Россия).

Для определения содержания свободного пролина использовали метод Бейтса (Bates et al., 1973). Интенсивность окрашивания комплекса пролина с нингидрином определяли спектрофотометрически при длине волны 520 нм на спектрофотометре СФ-2000. Количество пролина устанавливали по калибровочной кривой, используя стандартные растворы химически чистого L-пролина («Вектон», Россия).

Для изучения количества глутатиона и фитохелатинов в листьях и корнях пшеницы использовали метод ВЭЖХ. Разделение глутатиона и фитохелатинов проводили в аналитической колонке Phenomenex Luna 5u C18 при температуре колонки 37°C и скорости потока 0,5 мл/мин согласно методике Е. Снеллер с соавт. (Sneller et al., 2000). Количество глутатиона и фитохелатинов определяли по стандарту глутатиона («Sigma», США). Концентрацию фитохелатинов выражали в нмоль глутатиона эквивалентного г сырого веса. Расчет площадей пи-

ков осуществляли с помощью компьютерной программы МультиХром (Версия 1,5X). Общее содержание фитохелатинов представлено суммой: $\Phi X_2 + \Phi X_3 + \Phi X_4$.

Накопление транскриптов генов анализировали методом ПЦР в режиме реального времени. Тотальную РНК выделяли с помощью набора РНК-Экстран ("Синтол", Россия). кДНК синтезировали, используя набор для обратной транскрипции с M-MLV обратной транскриптазой и случайными (random) гексапраймерами ("Синтол", Россия). Количество и качество выделенной РНК и синтезированной кДНК проверяли спектрофотометрически. Амплификацию образцов проводили в приборе iCycler с оптической приставкой iQ5 (Био-Рад), используя наборы для амплификации с интеркалирующим красителем SYBR Green ("Синтол", Россия).

Повторности и статистическая обработка результатов. Повторность в пределах каждого варианта опыта 3–6-кратная, при определении проницаемости мембран и биометрических измерениях 20–40-кратная. Все опыты повторяли не менее трех раз. Результаты экспериментов обработаны с использованием общепринятых статистических методов. На рисунках и в таблицах представлены средние арифметические значения по нескольким независимым опытам и их стандартные ошибки. Достоверность различий между вариантами опытов оценивали с помощью критерия Стьюдента (при $P \leq 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние отдельного и совместного действия низкой температуры и сульфата кадмия на биометрические показатели растений пшеницы

Воздействие на растения низкой температуры и тяжелых металлов, также как и других неблагоприятных факторов среды, может приводить к торможению роста растений, что рассматривают как их неспецифическую ответную реакцию на изменение внешних условий (Чиркова, 2002; Кошкин, 2010). На основании специальных опытов с использованием широкого диапазона концентраций кадмия и пониженных температур была выбрана концентрация сульфата кадмия (100 мкМ) и температура воздействия (4°C), при которых происходило замедление роста пшеницы, однако полного его ингибирования не обнаружено.

В наших опытах низкая температура (4°C) действует на все растение, а кадмий первоначально проникает в корневую систему (уже через 1 ч от начала воздействия) и только по истечении некоторого времени поступает в побег. Учитывая это, нами было проведено изучение содержания кадмия в листьях. Установлено, что через 1 сут от начала воздействия сульфата кадмия на корни пшеницы происходит поступление и накопление ионов кадмия в листьях (табл. 1). С увеличением продолжительности воздействия (2–7 сут) его содержание продолжало возрастать (табл. 1). В случае совместного действия низкой температуры и кадмия его накопление в надземной части отмечено лишь через 2 сут,

причем в меньшей степени, чем при действии только сульфата кадмия (табл. 1). При более длительных экспозициях его уровень в листьях повышался, достигая максимума на 7-е сут. Однако, в этом случае содержание кадмия в листьях было в несколько раз ниже, чем при обработке сульфатом кадмия в условиях обычной температуры. Как известно, низкие температуры негативно влияют на поступление и транспорт воды и ионов в растении, в результате чего совместное действие температуры 4°C и кадмия приводит к меньшему его поглощению и накоплению в побеге пшеницы.

Таблица 1

Влияние раздельного и совместного действия температуры 4°C и сульфата кадмия (100 мкМ) на содержание кадмия (мкг/г сырой массы) в листьях пшеницы

Вариант	Экспозиция, сут				
	0	1	2	3	7
Cd	0,01±0,01	0,67±0,02	0,86±0,16	1,16±0,09	4,05±0,3
Cd+4°C	0,01±0,01	0,03±0,03	0,15±0,02	0,16±0,04	0,66±0,03

Установлено, что как раздельное, так и совместное действие низкой температуры (4°C) и кадмия (100 мкМ) приводит к торможению роста пшеницы (табл. 2). При этом ингибирование роста наблюдалось в большей степени под влиянием температуры 4°C. Так, например, высота растений пшеницы по отношению к исходному уровню за 7 сут в контроле увеличивалась примерно вдвое, тогда как при 4°C – всего на 19%, а при действии кадмия на – 33% (табл. 2). Следует отметить, что в начальный период (1–3 сут) совместного действия двух факторов не происходит усиления торможения роста по сравнению с действием только низкой температуры. Более длительное совместное действие температуры 4°C и кадмия приводило к большему снижению линейных размеров, чем их раздельное действие. Так, за 7 сут высота растений увеличилась лишь на 12 % (табл. 2), что свидетельствует о частичном суммировании негативных эффектов этих неблагоприятных факторов на ростовые процессы. Однако, как при раздельном, так и при совместном действии температуры 4°C и кадмия полное ингибирование роста не происходит.

Аналогичное действие низкая температура и кадмий оказывали на рост 1-го листа растений пшеницы (табл. 2). Его длина за 7 сут в контроле увеличилась на 65%, тогда как при 4°C – всего на 24 %, а при действии кадмия – на 43%. При совместном действии этих факторов прирост длины 1-го листа составил только 15% (табл. 2).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что более заметное торможение роста пшеницы происходит под влиянием температуры 4°C, тогда как кадмий (100 мкМ) оказывает несколько меньшее негативное воздействие. Совместное действие низкой температуры и кадмия приводит к частичному сум-

мированию их эффектов на ростовые процессы пшеницы, в результате чего отрицательное влияние этих факторов на рост было более выраженным, чем при их раздельном действии. Однако как при раздельном, так и совместном действии полного ингибирования роста не происходит, что свидетельствует о том, что температура 4°C и кадмий (100 мкМ) не оказывали повреждающего воздействия на растения.

Таблица 2

Влияние раздельного и совместного действия температуры 4°C и сульфата кадмия (100 мкМ) на ростовые показатели пшеницы

Вариант	Исходный уровень показателя, см	Значение показателя по отношению к исходному уровню, %					
		экспозиция, сут					
		0	1	2	3	6	7
Высота растений							
Контроль	16,0±0,1	100	119*	136*	148*	180*	194*
4°C	15,5±0,3	100	102	105*	108*	115*	119*
Cd	16,7±0,2	100	111*	119*	126*	132*	133*
4°C+ Cd	17,0±0,2	100	102	104*	106	109*	112*
Длина 1-го листа							
Контроль	12,5±0,1	100	122*	145*	159*	162*	165*
4°C	12,0±0,3	100	103	107*	110*	119*	124*
Cd	12,8±0,2	100	116*	126*	134*	143*	143*
4°C+ Cd	13,5±0,2	100	103	105*	108*	111*	115*

*Отличия от исходного уровня достоверны при $P \leq 0.05$.

Влияние раздельного и совместного действия низкой температуры и сульфата кадмия на холодоустойчивость растений пшеницы

Как известно, величина и скорость изменения холодоустойчивости растений зависят от интенсивности и продолжительности действия низкой температуры (Дроздов и др., 1984; Титов и др., 2006).

Нами была изучена динамика холодоустойчивости растений пшеницы при действии температуры 4°C. Установлено, что уже через 0,5–5 ч от начала охлаждения (4°C) устойчивость листьев растений пшеницы к промораживанию достоверно возрастает, затем в течение 1–7 сут она продолжает увеличиваться, достигая максимума на 6–7-е сут (табл. 3). Ранее было показано, что при действии низких закаливающих температур достоверное повышение холодоустойчивости растений озимой пшеницы сорта Мироновская 808 происходит примерно через 8 ч от его начала (Титов и др., 1989), тогда как у яровой пшеницы сорта Ленинградская 97 – через 1 сут (Таланова и др., 2011). В наших исследованиях повышение устойчивости пшеницы сорта Московская 39 при 4°C отмечено уже

через 0,5–1 ч. Таким образом, растения пшеницы этого сорта характеризуются способностью быстро адаптироваться к действию низких температур.

Под влиянием кадмия также происходило довольно быстрое, но меньшее по величине повышение устойчивости листьев к промораживанию, которое достигало максимума на 3-и сут (табл. 3). Необходимо отметить, что совместное действие низкой температуры и кадмия также приводило к повышению холодоустойчивости пшеницы через 5 ч от начала воздействия, а в дальнейшем она практически не изменялась до конца эксперимента (табл. 3).

Таблица 3

Влияние раздельного и совместного действия температуры 4 °С и сульфата кадмия (100 мкМ) на холодоустойчивость растений пшеницы

Экспозиция, ч	Холодоустойчивость (ЛТ ₅₀), °С		
	4°С	Cd	4°С+ Cd
0	-5,8±0,0	-5,8±0,0	-5,8±0,0
0,5	-6,0±0,0	-5,6±0,0	-5,7±0,1
1	-6,5±0,0	-6,1±0,1	-6,1±0,0
5	-6,5±0,1	-6,3±0,0	-6,5±0,1
24	-7,1±0,0	-6,5±0,0	-6,6±0,1
48	-7,3±0,1	-6,4±0,0	-6,6±0,1
72	-7,2±0,1	-6,6±0,1	-6,6±0,1
144	-8,5±0,1	-6,4±0,0	-6,7±0,0
168	-8,7±0,1	-6,4±0,0	-6,4±0,1

Отметим, что нами впервые была выявлена способность растений пшеницы к увеличению холодоустойчивости при действии кадмия и его совместном действии с низкой температурой.

Таким образом, судя по характеру изменения роста – интегрального показателя, отражающего реакцию растений на изменение условий среды, температура 4°С и сульфат кадмия в концентрации 100 мкМ не оказывают повреждающего действия на растения пшеницы. Более того, даже их совместное действие не приводит к полному ингибированию роста пшеницы. Еще более важен тот факт, что повышение холодоустойчивости происходит не только под влиянием температуры 4°С, но и при воздействии кадмия, хотя и в меньшей степени. Подобного рода данные могут рассматриваться как подтверждение функционирования неспецифических ответных реакций и кросс-адаптации (когда воздействие одного фактора способствует повышению устойчивости к другому фактору) растений к абиотическим факторам разной природы.

В целом, совокупность полученных результатов свидетельствует об активации под влиянием низких температур и кадмия механизмов адаптации растений пшеницы, что позволяет им сохранять жизнеспособность даже при довольно длительном воздействии этих абиотических факторов.

Динамика накопления транскриптов генов в листьях пшеницы при раздельном и совместном действии низкой температуры и сульфата кадмия

Формирование повышенной устойчивости связано с активацией целого комплекса адаптационных механизмов, в том числе с изменением экспрессии ряда генов, в частности, индукции генов, продукты которых играют важную роль в защитно-приспособительных реакциях растений, обеспечивающих их выживание в неблагоприятных условиях (Thomashow, 1999; Chinnusamy et al., 2006; George et al., 2008; Колупаев, Карпец, 2010; Haidarvand, Maali-Amiri, 2013). В частности, важными регуляторными белками, контролирующими программы онтогенеза растений, а также участвующими в процессах их адаптации, являются транскрипционные факторы.

В нашей работе было установлено, что низкая температура индуцирует в листьях пшеницы накопление транскриптов гена *CBF1*, кодирующего транскрипционный фактор CBF1 (CRT (C-repeat)-binding transcription factor) семейства AP2 (рис. 1). Повышение содержания мРНК гена *CBF1* происходило уже в начальный период ее действия (15–30 мин). При более длительном воздействии наблюдалось снижение содержания мРНК гена *CBF1*, однако, в конце эксперимента (3–6 сут) оно вновь повышалось. На 7 сут содержание транскриптов было близким к исходным значениям. Отметим, что воздействие кадмия также приводило к быстрой индукции накопления транскриптов гена *CBF1* в начальный его период, но через 5 ч – 1 сут происходило снижение содержания мРНК гена *CBF1*, однако при более длительном воздействии сульфата кадмия уровень мРНК возрастал и на 7 сут превышал исходные значения. При совместном действии низкой температуры и кадмия накопление транскриптов гена *CBF1* наблюдалось через 30 мин от начала опыта и сохранялось на повышенном уровне в течение всего эксперимента.

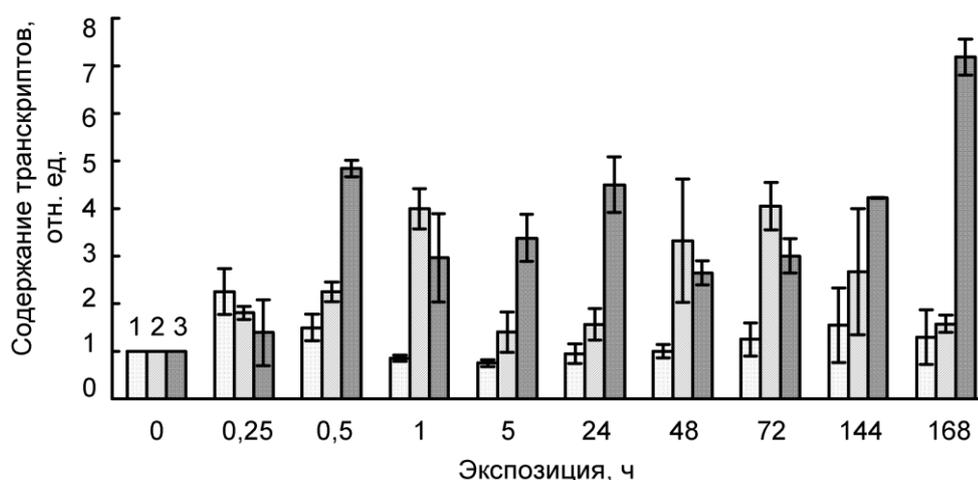


Рис. 1. Влияние температуры 4°C (1), сульфата кадмия (100 мкМ) (2) и их совместного действия (3) на содержание транскриптов гена *CBF1* в листьях пшеницы

Полученные результаты показали, что динамика содержания транскриптов гена *CBF1* уже в начальный период действия низкой температуры коррелирует с изменением холодоустойчивости растений (табл. 3). В частности, активация гена *CBF1* у пшеницы происходит уже в первые его минуты и предшествует повышению устойчивости. Это указывает на важную роль транскрипционных факторов CBF в формировании устойчивости растений к воздействию холода. Они способны связываться с участками CRT/DRE, расположенными в промоторной области COR генов холодового ответа (Saleh, Pages, 2003; Galiba et al., 2009; Medina et al., 2010), и таким образом участвуют в синтезе соответствующих белков.

В настоящее время довольно хорошо исследована экспрессия генов *CBF1* при воздействии низкой температуры, однако сведения о влиянии тяжелых металлов на их экспрессию единичны. Необходимо отметить, что данные о накоплении транскриптов гена *CBF1* при совместном действии низкой температуры и кадмия получены нами впервые. Наряду с этим нами изучена динамика содержания мРНК и других генов, кодирующих транскрипционные факторы, в частности *MYB80* и *DREB1* (данные представлены в диссертации).

В целом, на основании полученных данных и анализа литературы можно заключить, что гены транскрипционных факторов *CBF1*, *MYB80* и *DREB1* участвуют в неспецифических механизмах адаптации растений к действию неблагоприятных факторов разной природы.

Динамика накопления транскриптов *COR/LEA* генов в листьях пшеницы при отдельном и совместном действии низкой температуры и сульфата кадмия

Важную роль в механизмах адаптации растений к низким температурам, как известно, играют гены холодового ответа, в том числе гены, кодирующие *COR/LEA* (cold responsive / late embryogenesis abundant) белки (Thomashow, 1998; Rorat, 2001; Jan et al., 2009).

Нами изучена динамика накопления транскриптов гена *WRAB15*, относящегося к АБК-зависимым *COR*-генам, при действии низкой температуры, кадмия и их совместном действии. Показано, что через 1 сут от начала действия температуры 4°C в листьях пшеницы происходит резкое увеличение содержания транскриптов гена *WRAB15*, которое сохраняется и при дальнейшем действии холода (рис. 2). Воздействие ионов кадмия на проростки пшеницы в течение первых суток практически не сказывалось на экспрессии гена *WRAB15* в листьях, однако при более длительных экспозициях (3–7 сут) происходило усиление накопления транскриптов этого гена, хотя и менее значительное, чем при низкой температуре. При совместном действии кадмия и низкой температуры накопление транскриптов гена *WRAB15* наблюдалось через 1 сут от его начала и сохранялось на повышенном уровне до конца опыта (рис. 2).

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что накопление транскриптов гена *WRAB15* значительно возрастает в листьях пше-

ницы не только под влиянием низкой закаливающей температуры, но и кадмия, хотя и в меньшей степени. Поскольку в обоих случаях происходит повышение холодоустойчивости проростков пшеницы, можно предполагать, что кодируемые этим геном белки семейства LEA непосредственно участвуют в защитно-приспособительных реакциях, способствующих формированию устойчивости к низким температурам и соответственно, сохранению жизнеспособности растений в этих условиях.

В нашей работе проведено изучение экспрессии гена *WCS120* семейства *WCS* (wheat cold-specific), кодирующего гидрофильные осмопротекторные белки – дегидрины, специфичные для злаковых растений (Fowler et al., 2001; Delal et al., 2009; Wenifield et al., 2010; Liu et al., 2011). Показано, что в начальный период (15 мин – 5 ч) действия температуры 4°C происходит небольшое повышение содержания транскриптов гена *WCS120*, в то время как при более длительных экспозициях (1–7 сут) отмечено значительное увеличение уровня мРНК гена *WCS120*, сохраняющееся до конца эксперимента (рис 3). В отличие от этого, кадмий не оказывал существенного влияния на содержание транскриптов гена *WCS120*, в течение всего эксперимента содержание мРНК практически не превышало исходные значения. Совместное действие низкой температуры и кадмия приводило к повышению уровня мРНК гена *WCS120* в начальный его период (30 мин – 5 ч), через 1 сут происходило еще более значительное его увеличение, которое сохранялось на достигнутом уровне до конца эксперимента.

Считается, что ген *WCS120* специфически индуцируется у растений пшеницы при низкой температуре, в частности повышение экспрессии гена *WCS120* обнаружено у пшеницы при 5°C, а у ячменя при 10°C (Houde et al., 1992; Fowler et al., 2001). Отметим, что подобные данные о влиянии тяжелых металлов на накопление транскриптов гена *WCS120* у пшеницы ранее были не известны. В нашей работе не зафиксировано повышения содержания мРНК гена *WCS120* под влиянием кадмия. Это может свидетельствовать в пользу предположения о специфичности накопления мРНК и, соответственно, синтеза белка *WCS120* при гипотермии. Обнаруженное повышение накопления транскриптов гена *WCS120* при совместном действии низкой температуры и кадмия также, по-видимому, связано с реакцией растений пшеницы на охлаждение, а не на действие кадмия.

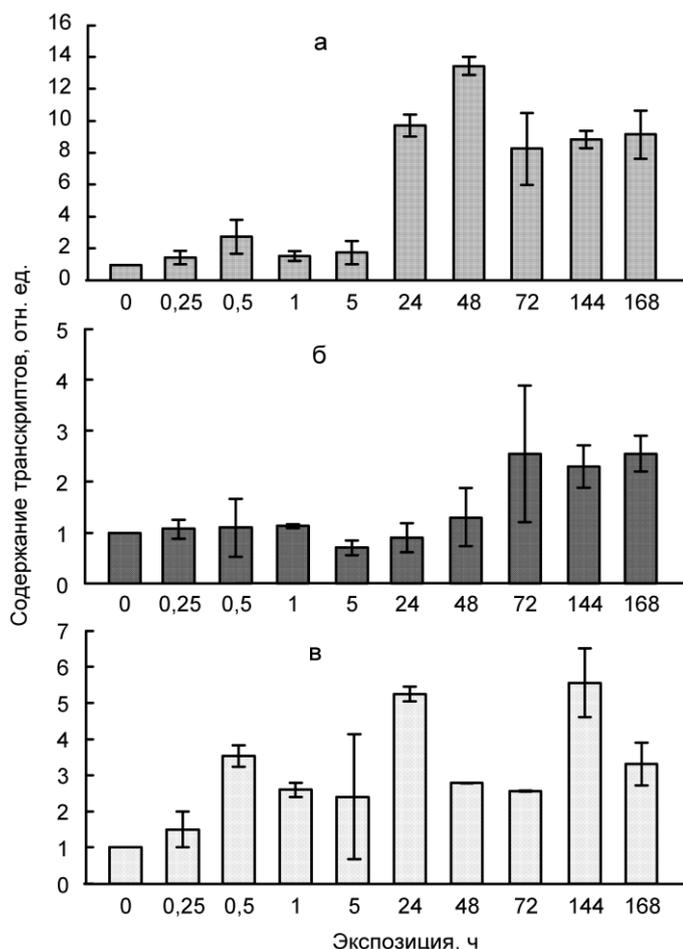


Рис. 2. Влияние температуры 4°C (а), сульфата кадмия (100 мкМ) (б) и их совместного действия (в) на содержание транскриптов гена *WRAB15* в листьях пшеницы

Возможно, что при одновременном действии двух факторов низкая температура оказывает преобладающее влияние на растения, поскольку значительное накопление мРНК гена *WCS120* и при низкой температуре, и при ее совместном действии с кадмием происходит при длительных экспозициях (1–7 сут).

Отметим, что под влиянием отдельного и совместного действия низкой температуры и кадмия в листьях пшеницы усиливается накопление транскриптов генов, кодирующих другие COR/LEA белки (*WCOR15*, *WRAB18*, *DHN13*), а также хлоропластные протеолитические ферменты (*Lon1*, *ClpP*) (данные представлены в диссертации).

В целом на основании полученных данных можно сделать вывод об участии ряда генов (*WCOR15*, *WRAB15*, *WRAB18*, *WDHN13*) COR/LEA белков и хлоропластных протеиназ (*Lon1*, *ClpP*) в неспецифических адаптивных реакциях растений в ответ на действие абиотических факторов разной природы. Вместе с тем накопление транскриптов гена *WCS120*, кодирующего белок *WCS120* семейства COR/LEA, указывает на его участие в большей степени в защитных реакциях на действие низких температур, чем на действие тяжелых металлов.

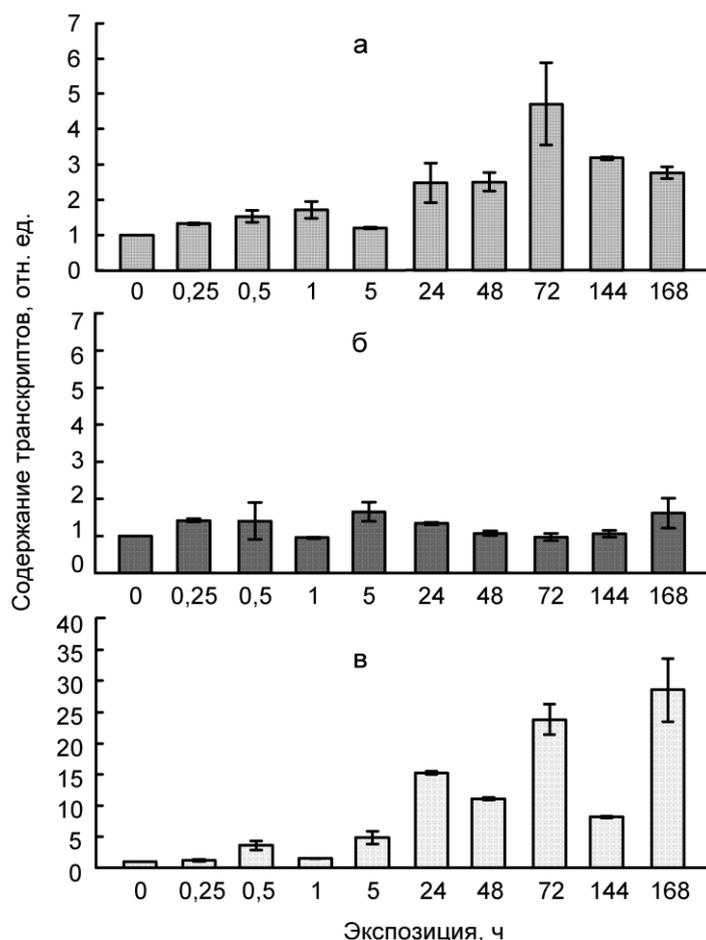


Рис. 3. Влияние температуры 4°C (а), сульфата кадмия (100 мкМ) (б) и их совместного действия (в) на содержание транскриптов гена *WCS120* в листьях пшеницы

Влияние отдельного и совместного действия низкой температуры и сульфата кадмия на содержание непротеиновых тиолов в листьях пшеницы

Различные неблагоприятные факторы среды, как известно, вызывают усиление накопления активных форм кислорода и, соответственно, активацию антиоксидантных систем, включающих и низкомолекулярные антиоксиданты (Колупаев, Карпец, 2010). К важным антиоксидантным низкомолекулярным соединениям, характерным для всех живых организмов, относится глутатион (Foyer, Noctor, 2005; Seth et al., 2012). Кроме того, глутатион и его производные, включая фитохелатины, являются ключевыми хелатирующими агентами, участвующими в механизмах детоксикации тяжелых металлов (Феник и др., 1995; Anjum et al., 2012).

В ходе наших исследований обнаружено, что при действии низкой температуры содержание глутатиона в листьях проростков пшеницы поддерживается на повышенном уровне в начальный его период, а в дальнейшем – постепенно снижается (рис. 4). Тем не менее, даже на 7-е сут опыта его содержание в листьях было достаточно высоким. В начальный период действия кадмия (15 мин – 1 сут) наблюдалось повышение уровня глутатиона, тогда как в дальнейшем

происходило его снижение. Значительное уменьшение (примерно в 2 раза) содержания глутатиона отмечено на 7-е сут. Совместное действие низкой температуры и кадмия в начальный его период (30 мин – 1 сут) вызывало повышение содержания глутатиона, а затем также наблюдалось снижение его уровня в листьях пшеницы, причем характер его изменения был сходен с таковым при действии только низкой температуры.

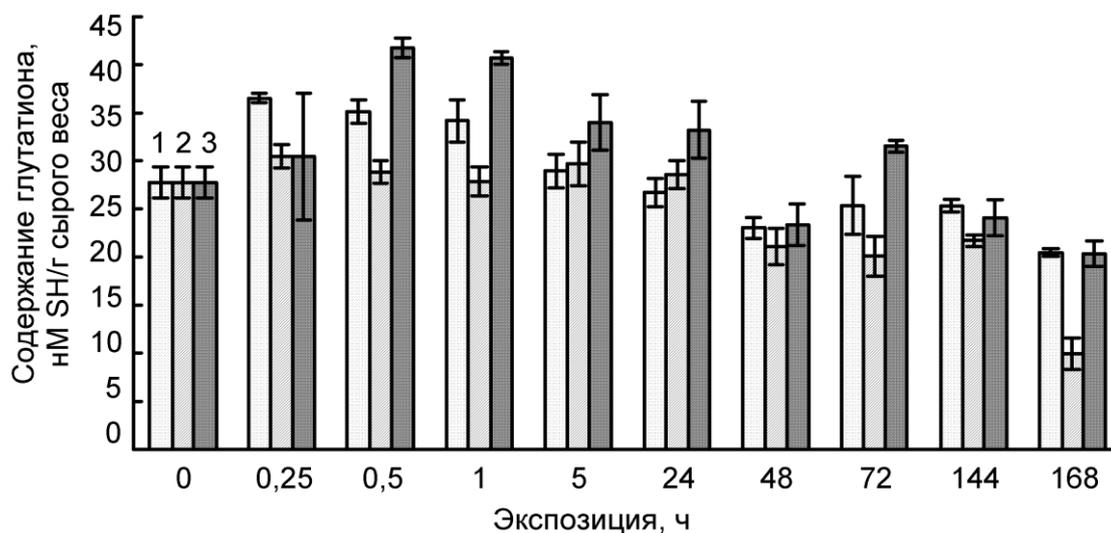


Рис. 4. Влияние температуры 4°C (1), сульфата кадмия (100 мкМ) (2) и их совместного действия (3) на содержание глутатиона в листьях пшеницы

Как известно, фитохелатины не являются генными продуктами, а синтезируются из глутатиона (Rauser, 1995; Серегин, 2001; Capdevila et al., 2012). В наших экспериментах воздействие кадмия приводило к увеличению содержания фитохелатинов уже через 15 мин от его начала и последующему усилению этого процесса при более длительных экспозициях (сутки) (рис. 5). Необходимо подчеркнуть, что повышение уровня фитохелатинов происходило на фоне снижения содержания глутатиона (рис. 4). Считается, что синтез фитохелатинов является специфической защитной реакцией растений в ответ на действие тяжелых металлов (Clemens et al., 1999; Cobbett, 2000; Pal, Rai, 2010). Однако, данные о синтезе фитохелатинов при действии низкой температуры в известной нам литературе отсутствуют. Поэтому нами было проведено изучение содержания фитохелатинов при низкой температуре и ее совместном действии с кадмием.

В результате исследований впервые было показано, что под влиянием гипотермии увеличение содержания фитохелатинов в листьях пшеницы происходит через 15 мин от начала опыта и сохраняется на повышенном уровне до его конца (рис. 5). Однако уровень фитохелатинов при низкой температуре был значительно ниже, чем при действии кадмия. Совместное действие низкой температуры и кадмия также приводило к увеличению содержания фитохелатинов в листьях пшеницы.

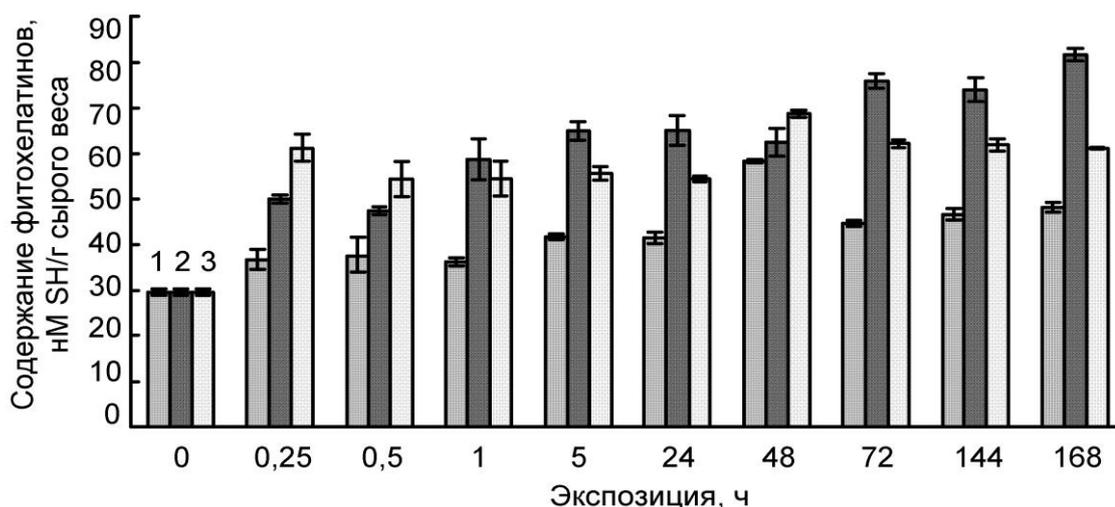


Рис. 5. Влияние температуры 4°C (1), сульфата кадмия (100 мкМ) (2) и их совместного действия (3) на содержание фитохелатинов в листьях пшеницы

Наблюдаемое нами снижение содержания глутатиона в листьях пшеницы на фоне повышения уровня фитохелатинов, может свидетельствовать о его расходовании на синтез фитохелатинов не только при действии кадмия, но и при охлаждении. В последние годы установлено, что содержание фитохелатинов может повышаться как при действии тяжелых металлов, так и некоторых других абиотических факторов – высоких температур (Zhang et al., 2006), засоления (Zagorchen et al., 2013) и УФ излучения (Bhargava et al., 2005). Эти и полученные нами данные позволяют рассматривать фитохелатины в качестве участников не только процессов детоксикации тяжелых металлов (как это считается многими исследователями в настоящее время), но и неспецифических реакций на действие других неблагоприятных факторов среды.

Ключевым ферментом синтеза фитохелатинов является фитохелатинсинтаза (Cobbett, 2000; Серегин, 2001; Cardevila et al., 2012). В связи с этим в нашей работе была изучена динамика накопления транскриптов гена *PCS1*, кодирующего фермент фитохелатинсинтазу, при раздельном и совместном действии низкой температуры и кадмия. Показано, что повышение содержания транскриптов гена *PCS1* происходит через 15 мин от начала воздействия ионов кадмия, тогда как низкая температура вызывает накопление мРНК гена при более длительных экспозициях (сутки) (рис. 6). Причем, уровень мРНК *PCS1* при действии кадмия более высокий, чем при гипотермии. Повышение мРНК гена *PCS1* наблюдалось также при совместном действии двух факторов.

Полученные нами результаты согласуются с известными данными об увеличении содержания фитохелатинов при действии тяжелых металлов (Clemens, 2006; Gallego et al., 2012). Это не удивительно, так как повышение содержания транскриптов гена *PCS1* и последующий синтез фитохелатинсинтазы определяет синтез фитохелатинов. Однако, учитывая сведения о динамике фитохелатинов при гипотермии, полученные впервые, можно предположить, что фитохелатины являются участниками процессов, лежащих в основе явления кросс-адаптации растений.

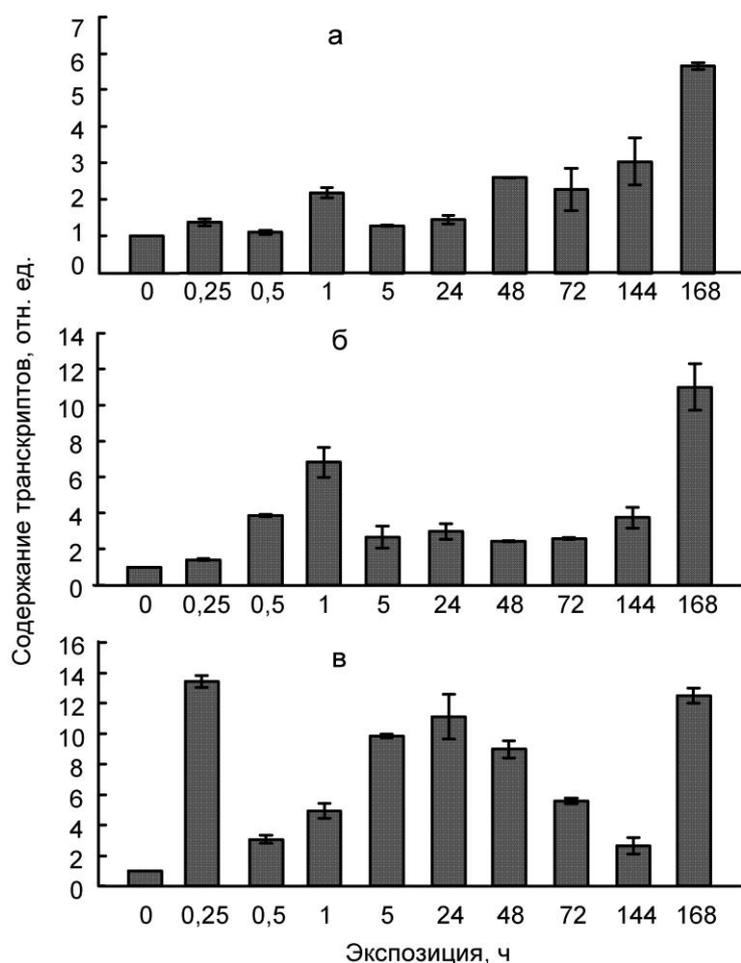


Рис. 6. Влияние температуры 4°C (а), сульфата кадмия (100 мкМ) (б) и их совместного действия (в) на содержание транскриптов гена *PCS1* в листьях пшеницы.

Влияние раздельного и совместного действия низкой температуры и сульфата кадмия на содержание свободного пролина в листьях пшеницы

Одной из неспецифических реакций растений в ответ на действие неблагоприятных факторов среды разной природы является повышение содержания свободного пролина – универсального протекторного соединения, обладающего полифункциональным действием (Кузнецов, Шевякова, 1999; Szabados, Savouze, 2010).

В ходе наших исследований было установлено, что раздельное и совместное действие низкой температуры и кадмия приводит к повышению содержания пролина в листьях проростков пшеницы. В частности, показано, что при действии температуры 4°C содержание пролина несколько увеличивается уже через 1 ч, значительно возрастает через 3-е сут и достигает максимума через 7 сут (рис. 7). Под влиянием кадмия содержание пролина повышалось через 5 ч от начала эксперимента и в дальнейшем продолжало увеличиваться в течение 7 сут. При низкой температуре происходит более интенсивное накопление свободного пролина, чем при воздействии ионов кадмия. Совместное действие

этих двух факторов уже в начальный его период также приводило к увеличению содержания пролина, которое и в дальнейшем сохранялось на повышенном уровне, достигая максимального значения на 7-е сутки.

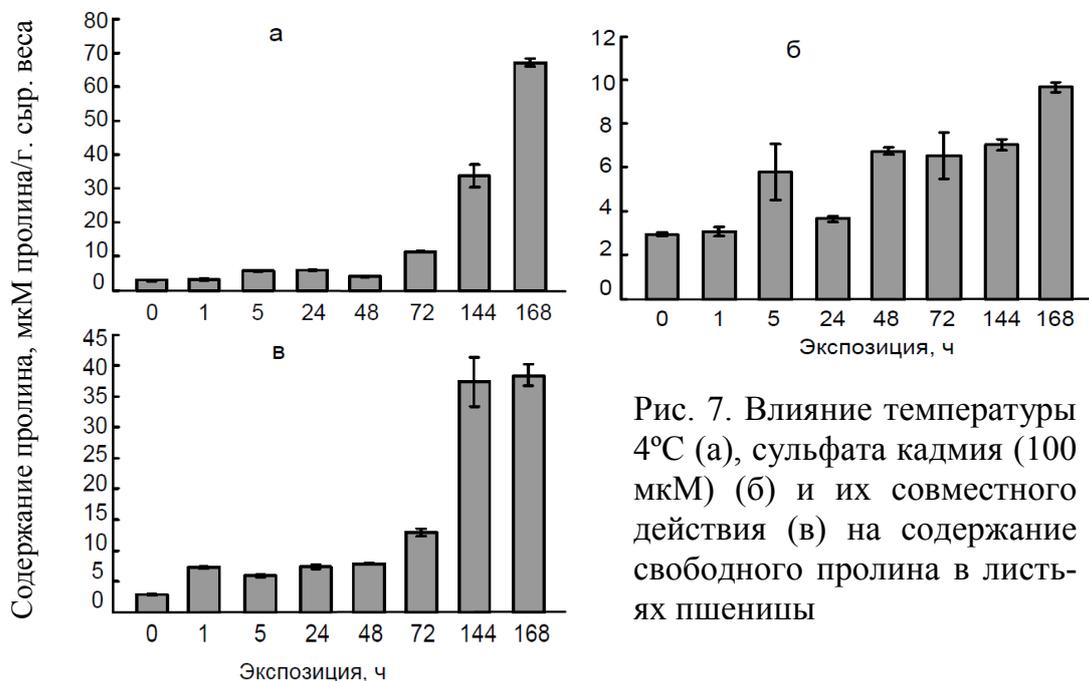


Рис. 7. Влияние температуры 4°C (а), сульфата кадмия (100 мкМ) (б) и их совместного действия (в) на содержание свободного пролина в листьях пшеницы

Увеличение содержания свободного пролина в листьях пшеницы коррелировало с накоплением транскриптов гена *WP5CS*, кодирующего пролин-5-карбоксилат синтетазу (фермент синтеза пролина) (рис. 8). Накопление мРНК гена *WP5CS* при действии низкой температуры происходило уже в начальный его период (первые минуты и часы), а через 2 сут отмечено еще более значительное повышение содержания транскриптов гена *WP5CS* (по сравнению с контролем), которое продолжало нарастать до конца эксперимента. Под влиянием кадмия наибольшее содержание транскриптов наблюдалось при длительных экспозициях (5–7 сут), тогда как при более коротких экспозициях (минуты, часы) наблюдалось незначительное изменение уровня мРНК. Совместное действие низкой температуры и ионов кадмия приводило к повышению уровня мРНК гена *WP5CS* уже через 15 мин от его начала, затем происходило его некоторое снижение при часовых воздействиях (1–5 ч), однако через 2 сут накопление транскриптов вновь повышалось, достигая максимума на 7-е сут опыта.

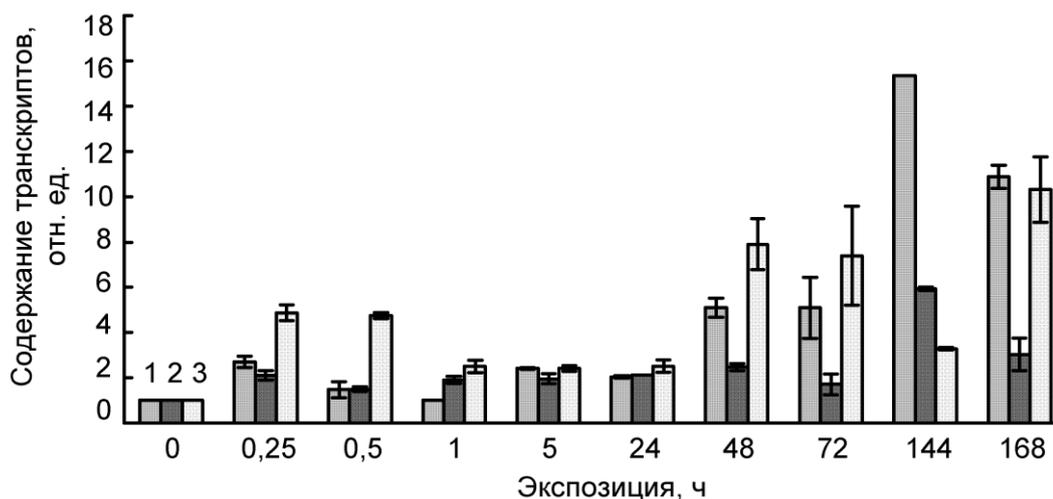


Рис. 8. Влияние температуры 4°C (1), сульфата кадмия (100 мкМ) (2) и их совместного действия (3) на накопление транскриптов гена *WP5CS* в листьях пшеницы

Полученные данные о накоплении транскриптов гена *WP5CS* коррелируются с результатами изучения содержания свободного пролина в листьях пшеницы. Слабое повышение содержания мРНК гена *WP5CS* в начальный период воздействия низкой температуры или ионов кадмия соответствовало содержанию пролина, близкому к исходному уровню. Повышение содержания транскриптов гена *WP5CS* в начальный период совместного действия низкой температуры и кадмия может свидетельствовать об участии гена *WP5CS* в неспецифической реакции проростков пшеницы на одновременное действие этих двух факторов разной природы.

Отметим, что результаты исследования содержания свободного пролина коррелируют с полученными данными по холодоустойчивости пшеницы (табл. 3). В частности, уже в начальный период (минуты, часы) действия низкой температуры, наряду с повышением холодоустойчивости растений наблюдалось накопление свободного пролина. Под влиянием кадмия также происходит повышение холодоустойчивости, но в меньшей степени, чем при охлаждении (4°C), что соотносится с данными об изменении содержания свободного пролина. Совместное действие низкой температуры и кадмия приводит к повышению холодоустойчивости уже в первые минуты и часы опыта, когда наблюдается накопление пролина.

В целом, сопоставление полученных данных с динамикой изменения устойчивости растений свидетельствует об участии свободного пролина в механизмах адаптации растений к действию разных абиотических факторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В природных условиях растения в течение жизни подвергаются воздействию неблагоприятных факторов среды разной природы, в том числе низкой температуры и тяжелых металлов, в частности кадмия. В силу этого не ослабевает интерес к изучению механизмов адаптации и устойчивости к ним.

В ходе наших исследований отдельного и совместного действия низкой закалывающей температуры (4°C) и кадмия в форме сульфата (100 мкМ) на растения пшеницы на ранних этапах развития были обнаружены как общие, так и специфические их реакции в ответ на действие этих факторов.

Установлено, что не только низкая температура приводит к повышению холодоустойчивости растений пшеницы, но также и ионы кадмия, однако в меньшей степени. При совместном действии этих факторов также наблюдалось повышение холодоустойчивости. Подобного рода данные свидетельствуют о проявлении кросс-адаптации, т.е. воздействие одного фактора способствует повышению устойчивости растений к фактору иной природы.

В ходе исследований накопления транскриптов генов, кодирующих адаптивные белки, было показано, что уже в начальный период воздействия кадмия и низкой температуры происходит повышение содержания мРНК генов транскрипционных факторов *CBF1*, *DREB1* и *MYB80*. Получены новые данные о влиянии кадмия и его совместного действия с низкой температурой на накопление транскриптов этих генов в листьях проростков пшеницы. Установлено, что усиление образования транскриптов *COR/LEA* генов (*WCOR15*, *WRAB15*, *WRAB18*, *WDHN13*) происходит и при отдельном, и совместном действии низкой температуры и кадмия, что свидетельствует об их участии в неспецифических реакциях растений в ответ на действие абиотических факторов разной природы. Однако, накопление транскриптов гена *WCS120*, кодирующего белок семейства *COR/LEA*, отличается специфичностью по отношению к действию низких температур, но не кадмия.

Установлено, что отдельное и совместное действие низкой температуры и кадмия приводит к усилению синтеза непротеиновых тиолов и пролина (низкомолекулярного осмопротектора и антиоксиданта) и повышению содержания транскриптов генов, кодирующие ферменты их синтеза (*PCS1* – фитохелатинсинтазы, *GSI* – глутатионсинтазы и *WP5CS* – пролин-5-карбоксилат синтазы) уже в начальный период действия абиотических факторов.

В целом, на основании полученных результатов можно заключить, что адаптация растений к действию низкой температуры и кадмия связана с широким спектром физиолого-биохимических и молекулярно-генетических механизмов, важное место среди которых занимает активация накопления транскриптов генов ряда адаптивных белков, усиление образования непротеиновых тиолов и низкомолекулярных антиоксидантов.

ВЫВОДЫ

1. Раздельное и совместное действие низкой закаливающей температуры и кадмия (в форме сульфата) приводит к торможению ростовых процессов и повышению холодоустойчивости растений пшеницы. При этом полного ингибирования роста и нарушения проницаемости мембран клеток листьев в данных условиях не происходит, что наряду с повышением устойчивости свидетельствует об активизации механизмов адаптации растений пшеницы к действию указанных абиотических факторов.

2. Накопление транскриптов генов, кодирующих регуляторные белки – транскрипционные факторы (*CBF1*, *MYB80*, *DREB1*), происходит уже в начальный период (минуты и часы) действия низкой температуры, ионов кадмия, а также при их совместном действии.

3. Адаптация растений к раздельному и совместному действию низкой температуры и кадмия связана с накоплением транскриптов генов, кодирующих *COR/LEA* белки (*WRAB15*, *WRAB18*, *WCOR15*, *WDHN13*) и протеолитические ферменты (*Lon1*, *ClpP*). В отличие от этого, накопление транскриптов гена *WCS120* в большей степени связано с повышением устойчивости растений к действию низкой температуры, чем кадмия.

4. Раздельное и совместное действие низкой температуры и кадмия уже в начальный период приводит к повышению содержания транскриптов генов глутатионсинтетазы, фитохелатинсинтазы, а также накоплению глутатиона и фитохелатинов.

5. Повышение устойчивости растений пшеницы к низкой температуре и кадмию, а также их совместному действию сопровождается усилением накопления низкомолекулярного осмопротектора и антиоксиданта – свободного пролина.

6. Совокупность полученных результатов позволяет заключить, что адаптация растений к таким неблагоприятным воздействиям, как низкая температура и ионы кадмия связана с широким спектром физиолого-биохимических и молекулярно-генетических механизмов, важное место среди которых занимает активация накопления транскриптов генов ряда белков, усиление образования непротеиновых тиолов (глутатиона, фитохелатинов) и низкомолекулярных антиоксидантов (глутатиона, пролина).

Список работ, опубликованных по теме диссертации
Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. Таланова В.В., Титов А.Ф., Топчиева Л.В., **Репкина Н.С.** Особенности экспрессии генов АБК-зависимых и АБК-независимых генов при холодной адаптации растений пшеницы // Физиология растений. 2011. Т. 58, № 6. С. 859–865.
2. Таланова В.В., Титов А.Ф., Топчиева Л.В., **Репкина Н.С.** Влияние кадмия на экспрессию генов протеолитических ферментов и их ингибиторов у проростков пшеницы // Труды Карельского научного центра РАН. 2011. №3. С. 112–117.
3. **Репкина Н.С.**, Таланова В.В., Топчиева Л.В., Батова Ю. В., Титов А.Ф. Влияние кадмия на экспрессию генов транскрипционных факторов CBF1 и DREB1 в листьях проростков пшеницы // Труды Карельского научного центра РАН. 2012. №2. С. 113–118.
4. Таланова В.В., Титов А.Ф., **Репкина Н.С.**, Топчиева Л.В. Гены холодового ответа COR/LEA участвуют в реакции растений пшеницы на действие тяжелых металлов // Доклады академии наук. 2013. Т. 448, № 2. С. 242–245.
5. **Репкина Н.С.**, Таланова В.В., Титов А.Ф. Влияние тяжелых металлов на экспрессию генов у растений // Труды Карельского научного центра РАН. 2013. №3. С. 31–46.

Публикации в других изданиях

6. Таланова В.В., Титов А.Ф., Фролова С.А., Топчиева Л.В., **Репкина Н.С.**, Малышева И. Е. Влияние низкой температуры и кадмия на экспрессию генов протеолитических ферментов и их ингибиторов у растений пшеницы // Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий: материалы докладов VII съезда Общества физиологов растений России (Нижний Новгород, 04-10 июля 2011 г.). Нижний Новгород, 2011. С. 681-682.
7. **Репкина Н.С.** Влияние кадмия на экспрессию генов протеолитических ферментов у проростков пшеницы // Белки и пептиды: Сб. тез. V Российского симпозиума (Петрозаводск, 08-12 августа 2011 г.). Петрозаводск, 2011. С. 404.
8. **Репкина Н.С.**, Таланова В.В., Топчиева Л.В., Титов А.Ф. Влияние низкотемпературного закаливания на экспрессию АБК-зависимых и АБК-независимых генов растений яровой пшеницы // Регуляция роста, развития и продуктивности растений: Материалы VII-ой международной научной конференции (Минск, 26-28 октября 2011 г.). Минск, 2011. С. 173.
9. **Репкина Н.С.**, Таланова В.В., Топчиева Л.В., Титов А.Ф. Изменение уровня экспрессии АБК-зависимых генов у проростков пшеницы при действии кадмия и низкой температуры // Сб. тез. Всероссийского симпозиума экология мегаполисов: фундаментальные основы и инновационные технологии и школы для молодых ученых по экологической физиологии растений (Москва, 21-25 ноября 2011 г.). Москва, 2011. С. 128.
10. **Репкина Н.С.** Изменение экспрессии генов транскрипционных факторов CBF1 и DREB1 в листьях проростков пшеницы при действии кадмия // Ломоносов–2012: Сб. тез. XIX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (Москва, 09-13 апреля 2012 г.). Москва, 2012. С. 238-239.
11. Таланова В.В., **Репкина Н.С.**, Топчиева Л.В., Титов А. Ф. Изменение экспрессии гена дегидрина при адаптации растений пшеницы к неблагоприятным факторам среды // Адаптационные стратегии живых систем: Сб. тез. Междисциплинар-

ной научной конференции (Новый Свет, 11-16 июня 2012 г.). Крым, Украина 2012. С. 325-326.

12. Talanova V.V., Topchieva L.V., **Репкина N.S.**, Titov A.F. Hormone effect on protease genes expression // Intracellular Signaling and Bioactive Molecules Design: Abstracts of 3rd International Symposium (Lviv, 17-23 of September 2012.). Lviv, Ukraine 2012. С. 28

13. **Репкина Н.С.**, Таланова В.В., Топчиева Л.В., Титов А.Ф. Экспрессия генов АТФ-зависимых протеиназ у растений пшеницы при действии низкой температуры и кадмия // Тезисы докладов II (X) Международной ботанической конференции молодых ученых (Санкт-Петербург, 11-16 ноября 2012 г.). Санкт-Петербург, 2012. С. 69.

14. **Репкина Н.С.**, Таланова В.В. Исследование молекулярных механизмов устойчивости растений к действию кадмия // Труды международного форума по проблемам науки, техники и образования. Под ред.: Малинникова В.А., Вишневого В.В. Москва, 2012. С.111-112.

15. **Репкина Н.С.**, Таланова В.В., Топчиева Л.В. Активация экспрессии гена фитохелатинсинтазы у проростков пшеницы под влиянием кадмия и низкой температуры // Биология – наука XXI века: Сб. тез. 17-й международной Пущинской школы-конференции молодых ученых (Пущино, 21-26 апреля 2013 г.). Пущино, 2013. С. 498-499.

16. **Репкина Н.С.**, Таланова В.В., Топчиева Л.В., Титов А.Ф. Действие абиотических стресс-факторов на экспрессию генов протеолитических ферментов у растений // Белки и пептиды: Сб. тез. VI Российского симпозиума (Уфа, 11-15 июня 2013 г.). Уфа, 2013. С. 247.

17. **Репкина Н.С.**, Таланова В.В., Титов А.Ф. Экспрессия гена в листьях проростков пшеницы фитохелатинсинтазы у проростков пшеницы под влиянием кадмия и низкой температуры // Инновационные направления современной физиологии растений: тезисы докладов всероссийской научной конференции с международным участием (Москва, 2-6 июня 2013 г.). Москва, 2013. С. 333.

18. **Репкина Н.С.**, Таланова В.В., Титов А.Ф. Исследование экспрессии генов транскрипционных факторов DREB1 и DREB2 в листьях пшеницы при адаптации к холоду // XIII съезд РБО: труды XIII съезда РБО (Тольятти, 16-22 сентября 2013 г.). Тольятти, 2013. С.238-239.

19. **Репкина Н.С.**, Таланова В.В., Топчиева Л.В. Устойчивость растений к тяжелым металлам и экспрессия генов: учебное пособие. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2013. 32 с.