Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова
Кафедра физиологии растений
Московская Гимназия на Юго-Западе №1543

Участие ЭПР-телец *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., 1842 в реакции растения на тепловой стресс

Никита Петрович Тихомиров

Научный руководитель:
к.б.н. Татьяна Николаевна Бибикова

Москва 2015

Введение

В 1965 году в эпидермальных и кортикальных клетках корня редьки (*Raphanus sp.*) были впервые обнаружены продолговатые выросты эндоплазматического ретикулума, 5 мкм в длину и 0,5 мкм в диаметре, которые впоследствии получили название ЭПР-тельца (англ. endoplasmic reticulum bodies – ER bodies) (рис.1). Последние исследования показали, что эти образования характерны для растений семейств Brassicaceae, Capparaceae и Cleomaceae порядка Brassicales. У *Arabidopsis thaliana* ЭПР-тельца встречаются повсеместно в клетках молодых проростков растений, а также в клетках корня взрослых растений. При механическом повреждении листьев прикорневой розетки ЭПР-тельца образуются там de novo, аналогичный эффект показан также для воздействия жасмоновой кислотой – гормона стресса, образующегося при окислении клеточной мембраны в растениях (Nakano et al., 2014). ЭПР-тельца находятся в клетках корней растения на протяжении всей его жизни, в розеточных листьях взрослых растений же они встречаются редко и могут вновь появиться там только в результате вышеописанных воздействий.

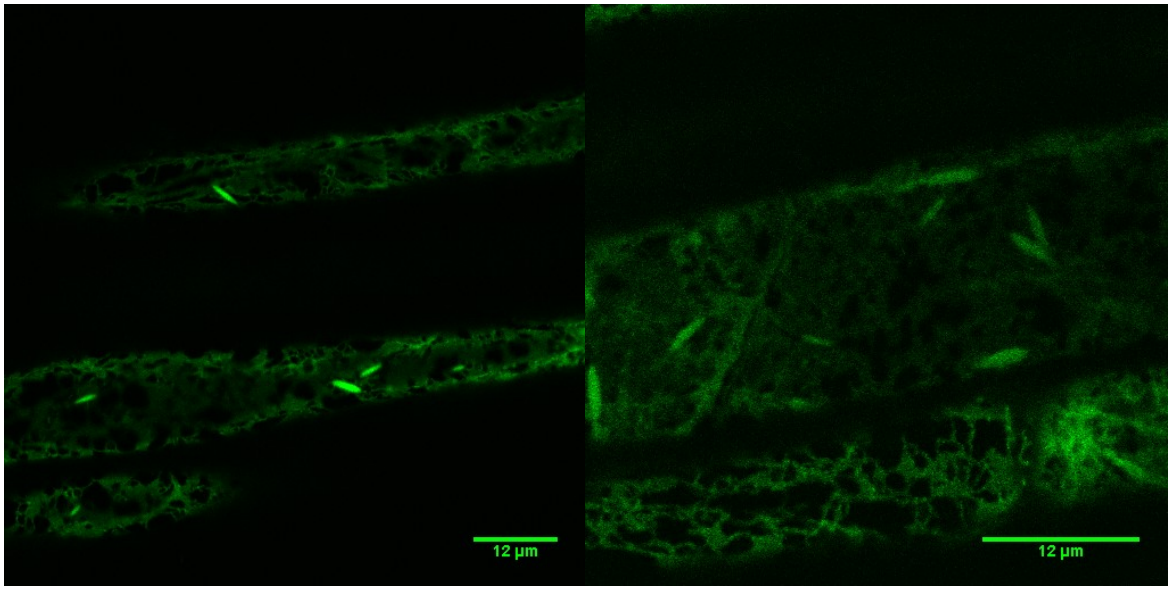

Рис.1. ЭПР-тельца в клетках корня *A.thaliana*. Яркие зелёные пятна – ЭПР-тельца, зелёная сеть – ЭПР. Конфокальный микроскоп. Фото: Е.С. Глаголева.

Со времени открытия эти ЭПР-тельца всесторонне изучались. Одним из результатов стало открытие нескольких белков, концентрация которых высока именно в этих структурах. Один из них – PYK10 – обладает мирозиназной, глюкозидазной и фукозидазной активностью, то есть может отщеплять от молекул гликозидов углеводную часть, в частности, образовывать из глюкозинолатов-предшественников индольные соединения – биологически активные вещества, использующиеся растением для борьбы с фитопатогенами, что позволяет предположить иммунную функцию ЭПР-телец. Также в ЭПР-тельцах локализованы белки, обладающие протеазной активностью – VPE и RD21. Экспрессия генов обоих белков увеличивается при стрессовом воздействии на растение. Было показано также, что при помещении растения в среду со смертельной концентрацией соли при гибели клеток эпидермиса проростков *A. thaliana* их ЭПР-тельца сливаются с вакуолью и друг с другом, возможно, для образования новых веществ из предшественников, находящихся в вакуоли.

Возможно, функция ЭПР-телец в таком случае – быстрое образование биологически активных веществ при гибели клетки. Локализация протеаз в ЭПР-тельцах позволяет быстрее, в обход аппарата Гольджи, доставить их в вакуоль при стрессовом воздействии на растения (Hayashi et al., 2001). Однако точно функция ЭПР-телец неизвестна.

2 белка – MEB1 и MEB2 (от англ. membrane of ER body), обнаруженные в 2013 году, – встречаются только в мембране ЭПР-телец (Yamada et al., 2013). Они похожи друг на друга множественными трансмембранными участками. Секвенирование их аминокислотных последовательностей показало наличие в них последовательности DUF125, характерной для белков семейства VIT, функционирующих как транспортёры ионов металлов в разных царствах живых организмов (англ. vacuolar iron transporter – транспортёр железа в вакуолях). Для белков MEB1 и MEB2 показана железо/марганцевая транспортная активность – культура дрожжей, экспрессировавших эти белки вместо своего собственного железо/марганцевого транспортёра CCC1 из того же семейства, смогла жить на среде с повышенной концентрацией железа, в то время как без этих белков культура умирала (Yamada et al., 2013).

Было установлено также, что в результате теплового воздействия на *A. thaliana* уровень экспрессии генов всех белков, локализованных в ЭПР-тельцах, падает. Падает также уровень экспрессии гена транскрипционного фактора NAI1, регулирующего формирование ЭПР-телец (Nakano et al., 2014) (в эксперименте растения подвергались воздействию температуры 38°C на протяжении 3 часов) (Kilian et al., 2007). В связи с этим возникает вопрос об участии ЭПР-телец в реакции растения на абиотический стресс, в частности, на тепловой стресс. Доводом в пользу предположения об участии ЭПР-телец в работе механизмов акклимации к стрессу может служить также то, что экспрессия белка PYK10, локализованного в люмене ЭПР-телец, регулируется GRP2, РНК-связывающим белком, который участвует в регуляции прорастания семян в условиях разных абиотических стрессов (Kim et al., 2007). Показано также, что мутант *A. thaliana* TU8 по гену TFL2, растительному гомологу гена белка гетерохроматина HP1 у животных, в клетках которого наблюдается недостаток глюкозинолатов по сравнению с диким типом, отличается пониженной теплоустойчивостью (Ludwig-Müller et al., 2000), а белок люмена ЭПР-телец PYK10 обладает мирозиназной активностью, то есть разрушает глюкозинолаты (Nakano et al., 2014). Следовательно, из-за того, что при акклимации к высоким температурам экспрессия гена PYK10 падает, количество глюкозинолатов должно увеличиваться, а повышенное количество глюкозинолатов – признак, противоположный признаку мутанта TU8 с пониженной теплоустойчивостью.

Тепловой шок, вызываемый воздействием высоких температур, может повлечь за собой задержку роста, снижение эффективности фотосинтеза, нарушение работы репродуктивной системы и другие последствия (Vierling et al., 2005). Но, если перед тепловым шоком растение несколько часов подвергалось воздействию нелетальных высоких температур, то эффект от теплового шока выражается в меньшей степени, поскольку происходит акклимация растения к высоким температурам. Один из основных способов, которыми обеспечивается повышенная устойчивость растения к высоким температурам после акклимации, - изменение структуры молекул ферментов, приводящее к изменению их каталитических свойств. Поскольку в пределах температурного оптимума

фермента при повышении температуры скорость его ферментативной реакции экспоненциально возрастает, для поддержания нужного клетке баланса между реагентами и продуктами реакции в условиях меняющейся температуры каталитические свойства фермента должны измениться, чтобы изменилась энергия активации ферментативной реакции. Это достигается образованием в молекуле фермента дополнительных связей, что также приводит к повышению её термоустойчивости (устойчивости к денатурации) (Алехина и др., 2007).

Сейчас выделяют 2 механизма акклимации к повышенным температурам: кратковременный (англ. short-term acquired thermotolerance, SAT) и долговременный (long-term acquired thermotolerance, LAT), которые обеспечиваются разными группами белков теплового шока (Yeh et al., 2012). Белки теплового шока обычно имеют молекулярную массу в десятки тысяч дальтон и в основном функционируют как молекулярные шапероны, однако функции некоторых из них слабо изучены (Vierling et al., 2005). Механизмы SAT работают в течение первых нескольких часов после теплового шока, механизмы LAT – в течение первой пары дней.

В ЭПР-тельцах при акклимации регуляции подвергается уровень экспрессии белков, причём сразу всех белков, локализованных в ЭПР-тельцах. Понижение уровня экспрессии генов всех белков клеточной структуры не является обычным способом приспособления клетки растения к повышенной температуре, его нельзя наблюдать у остальных структур клеток *A. thaliana*. Поэтому необходимо изучить то, как изменяются ЭПР-тельца при акклимации к высоким температурам и как будут вести себя в условиях высокой температуры нокауты по генам белков ЭПР-телец.

Цель работы:

Изучить воздействие, оказываемое повышенными температурами на ЭПР-тельца корней проростков *A. thaliana*, и участие их мембранного белка MEB1 в акклимации растения к повышенным температурам.

Задачи:

1) Изучить изменение внешнего вида и характера расположения ЭПР-телец в результате воздействия на растение повышенной температурой, как с предшествующей акклимацией, так и без неё;
2) Сравнить эффективность работы механизмов тепловой акклимации у растений дикого типа и у нокаута по гену мембранного белка ЭПР-телец MEB1.

Материалы и методы

Высадка и содержание растений

Семена резуховидки Таля (*Arabidopsis thaliana*) мы стерилизовали 5 минут в 75% спирте с добавлением 0,1% детергента Triton X-100 в течении 5 минут, после чего высаживали в чашки Петри размерами 90 × 15 мм на 25 мл среды, состоящей из

0,5 × Murashige & Skoog medium с добавлением 0,5% желирующего агента Phytagel и 1% сахарозы.

Растения в чашку Петри мы высаживали четырьмя несообщающимися группами по 10-20 семян: 2 группы растений дикого типа и 2 группы мутантов *meb1* с нерабочим мембранным белком ЭПР-телец MEB1. Гомозиготные семена мутантов были получены в Salk Institute Genomic Analysis Laboratory путём вставки одной или нескольких нуклеотидных последовательностей в ген *MEB1*. Группы мы высаживали, набирая из взвеси семян резуховидки в 0,18% агар-агаре с известной концентрацией семян определённый объём при помощи мерной пипетки в стерильных условиях (ламинар-бокс с горизонтальным потоком воздуха). Всего было изучено около 100 проростков *A. thaliana* дикого типа (экотип Columbia-0) и 100 проростков нокаута по гену белка MEB1.

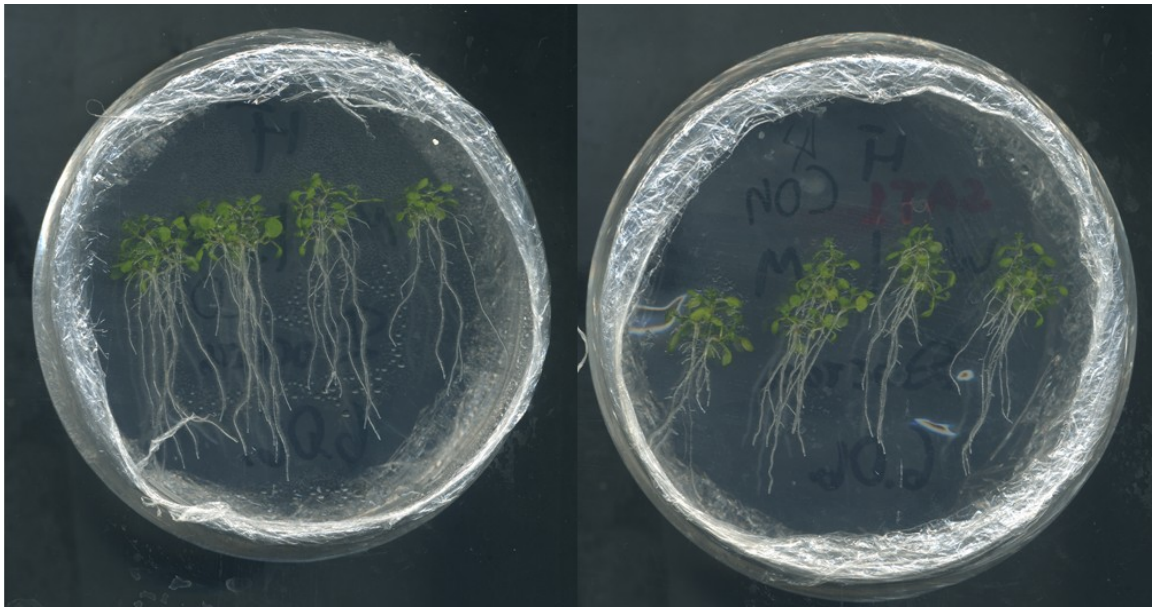

Рис. 2. Запечатанные чашки Петри с растениями через 2 дня после эксперимента, вид снизу. Слева растения, оставленные в качестве контроля, справа – растения, подвергавшиеся тепловому воздействию.

Исследование теплоустойчивости

Сначала мы содержали растения при температуре около 4°C в темноте на протяжении 3 дней для одновременного прорастания, затем растили при температуре 24°C вертикально (для облегчения последующего измерения удлинения корней) на свету интенсивностью 70 мкмоль/м^2×сек 6 дней. Затем мы половину чашек Петри оставляли для контроля в тех же условиях, а вторую половину исследовали на эффективность работы механизма кратковременной тепловой акклимации. Сначала герметично запечатанные чашки Петри с растениями мы помещали в таз с водой, нагретой до 37-38°C на час, потом, после перерыва длиной в 2 часа при температуре 24°C, - в воду с температурой 44-45°C на 45 минут - воздействие столь высокой температурой растения способны переносить только в акклимированном состоянии, как показали предыдущие эксперименты (Yeh et al., 2012). Таким образом, мы проверяли эффективность работы механизмов SAT. Затем для определения состояния растений после

теплового шока у всех проростков мы анализировали удлинение корней за 2 дня после теплового воздействия и содержание хлорофиллов a и b.

Такой выбор тепловых воздействий и среды для выращивания растений обусловлен предыдущим применением схожих воздействий и схожей среды для выполнения работ по исследованию ответа на тепловой шок у резуховидки (Charng et al., 2006, Hong, Vierling, 2000, Yeh et al., 2012). В качестве желирующего агента вместо агар-агара был взят Phytagel, так как его прозрачность упрощает измерение длины корней проростков.

Анализ удлинения корней

В ходе эксперимента мы сканировали все растения в чашках Петри дважды на чёрном фоне: один раз сразу после теплового воздействия и один раз ещё через 2 дня. После наложения двух рисунков получалось удлинение, которое мы впоследствии и измеряли.

Анализ содержания хлорофиллов a и b

Через 3 дня после теплового воздействия из зелёных частей растений каждой из четырёх групп мы составили отдельную навеску (массой 15-80 мг), которую затем растирали в 1,5 мл 96% этанола с добавлением небольшого количества $CaCO_3$ (для нейтрализации кислот клеточного сока) до приобретения белого цвета (пока весь хлорофилл не выходил в раствор). Затем мы отделяли остатки растений на центрифуге, а у супернатанта объёмом 1 мл, разбавленном ещё в 2 мл этанола, анализировали оптическую плотность в луче электромагнитных волн длиной 665 и 649 нм. Затем мы вычисляли содержание в растворе хлорофиллов a и b по формулам для вытяжки растений в 96% этаноле (Wintermans, De Mots, 1965):

$$c_a = 13{,}7 \times A_{665} - 5{,}76 \times A_{649};$$
$$c_b = 25{,}8 \times A_{649} - 7{,}6 \times A_{665},$$

где c_a и c_b – концентрация хлорофиллов a и b соответственно, A_{665} и A_{649} – оптическая плотность вытяжки в луче света с длиной волны 665 и 649 нм соответственно.

Наблюдения через конфокальный микроскоп

Параллельно с описанным экспериментом в аналогичных условиях мы вырастили 4 чашки Петри со случайно расположенными проростками *A. thaliana*, экспрессирующими GFP в ЭПР-тельцах, для последующего их исследования на конфокальном микроскопе. Половину чашек мы подвергали такому же воздействию, что и в эксперименте, вторая же половина претерпевала летальное тепловое воздействие водой с температурой 44°C в течение 45 минут без акклимации. Растения помещались под микроскоп в воде между двумя стёклами. В наблюдениях использовался лазер с длиной волны 488 нм и фильтр long pass 505. Чашки с проростками, подвергшимися тепловому шоку после акклимации, мы наблюдали через 40 и 80 минут после окончания воздействия, а растения, которые мы подвергли тепловому шоку без акклимации, - через 30 и 60 минут. Наблюдения были направлены на визуальную оценку наличия или отсутствия изменения формы, размера, количества и расположения ЭПР-телец в клетках корней проростков. Также мы измеряли объём ER-телец, принимая их форму за

эллипсоид вращения и измеряя на фотографиях, полученных на микроскопе, их длину и ширину.

Статистические измерения

Вычисления, статистические тесты и построение графиков мы проводили в статистической среде R 3.0.2 (R Development Core Team, 2013). Для установления статистической достоверности различий между парами выборок мы использовали тест Вилкоксона. Иллюстрировали различия в выборках мы при помощи диаграмм размаха, на которых обозначен абсолютный и квартильный размах, медиана, а также выбросы (значения, удалённые от ближайшей квартили более чем на 1,5 межквартильных размаха. Для установления наличия или отсутствия зависимости между двумя переменными мы вычисляли непараметрический коэффициент Спирмена.

Результаты

В чашках Петри, подвергавшихся тепловому воздействию, не была обнаружена разница в удлинении корней у мутантных растений и у растений дикого типа (p=0,3492). Мы не обнаружили разницы в содержании хлорофиллов a, b, обоих хлорофиллов вместе и в их отношении, а также в содержании хлорофиллов в расчёте на одно растение из кучки ни в контроле, ни в чашках Петри, подвергавшихся тепловому воздействию, кроме двух случаев (прил. 1). Однако выводов о наличии у мутанта фенотипа, отличного от дикого, из наличия этих различий сделать нельзя (см. обсуждение).

Нами была обнаружена слабая, но достоверная зависимость удлинения корней от числа растений в кучке среди растений, подвергавшихся тепловому шоку (корреляционный коэффициент Спирмена=0,3635, p=0,0005). При более подробном рассмотрении выяснилось, что удлинение зависит от числа растений в кучке только у нагревавшихся растений, мутантных по гену белка MEB1 (корреляционный коэффициент Спирмена=0,427, p=0,0038), у дикого типа же такой зависимости нет (p=0,1282). Выяснилось также, что слабая достоверная зависимость есть среди контрольных растений дикого типа, однако здесь она отрицательна (корреляционный коэффициент Спирмена=-0,3732, p=0,009). Однако число растений в кучке довольно сильно различалось у мутантов и у дикого типа – 11,6 ± 3,4 у мутантов и 16,6 ± 4,9 у дикого типа при общем числе семян в кучке 14,3 ± 4,9 (указаны средние значения ± стандартное отклонение), поэтому говорить о природе этих зависимостей затруднительно.

Также мы сравнивали содержание хлорофиллов по отдельности и вместе, их отношение, содержание хлорофиллов в расчёте на одно растение в кучке, а также удлинение корней у растений в двух крайних и в двух центральных кучках в каждой чашке Петри. Ни в одном случае достоверных различий обнаружено не было (удлинение корней: контрольные чашки Петри – p=0,4548, экспериментальные – p=0,3605, хлорофиллы – см. прил. 1)

При наблюдении растений, подвергавшихся тепловому шоку, на конфокальном микроскопе, мы обнаружили, что у растений через полчаса после теплового шока без акклимации ЭПР-тельца перестают двигаться (в норме они перемещаются по клетке) и меняют форму. Они укорачиваются (если в клетках

контрольных растений их длина около 5 мкм, то в растениях, перенёсших тепловой шок, длина их сокращается до 1,5-2 мкм), их форма приближается к шарообразной. Объём таких шаров превышает объём ЭПР-телец в корнях контрольных растений (тест Вилкоксона, $p=1,8*10^{-7}$, рис.1). Через 60 минут после теплового шока в большинстве клеток корня отсутствовали ЭПР-тельца. ЭПР-тельца в тех клетках, где их можно было наблюдать, были также шарообразной формы и не двигались.

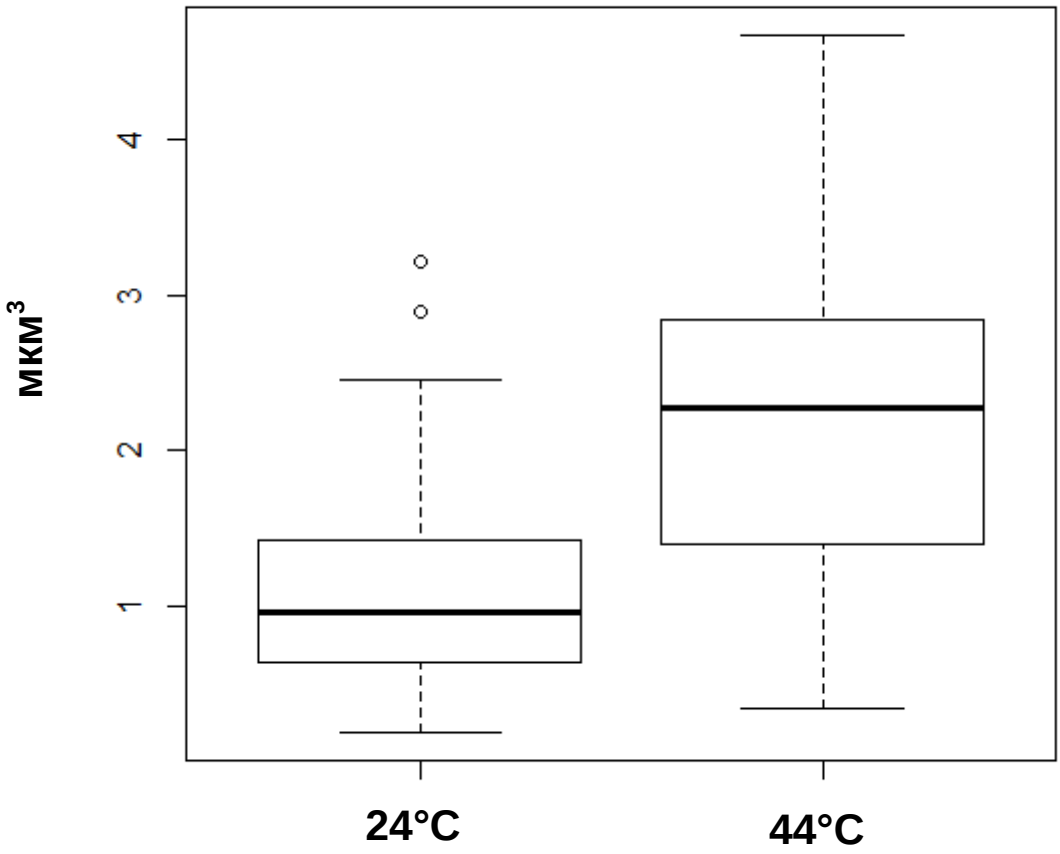

Рис. 3. Объём ЭПР-телец в зависимости от температурных условий через полчаса после воздействия. 24°C – растение не подвергалось тепловому шоку, 44°C – растение находилось в воде с температурой 44°C в течение 45 минут.

У растений, которые мы ранее подвергали тепловому шоку с предварительной акклимацией, через 40 минут после воздействия ЭПР-тельца двигались так же, как и в контроле, однако их форма также отличалась от нормальной. Вместе с ЭПР-тельцами нормальной формы попадались сильно удлинённые и изогнутые ЭПР-тельца (рис. 4). В контрольных растениях такие ЭПР-тельца встречались крайне редко (был замечен один случай во всех клетках всех образцов). В

отличие от ЭПР-телец неакклимированных растений, ЭПР-тельца в клетках растений, которые мы подвергали предварительной акклимации, двигались, как и в контроле.

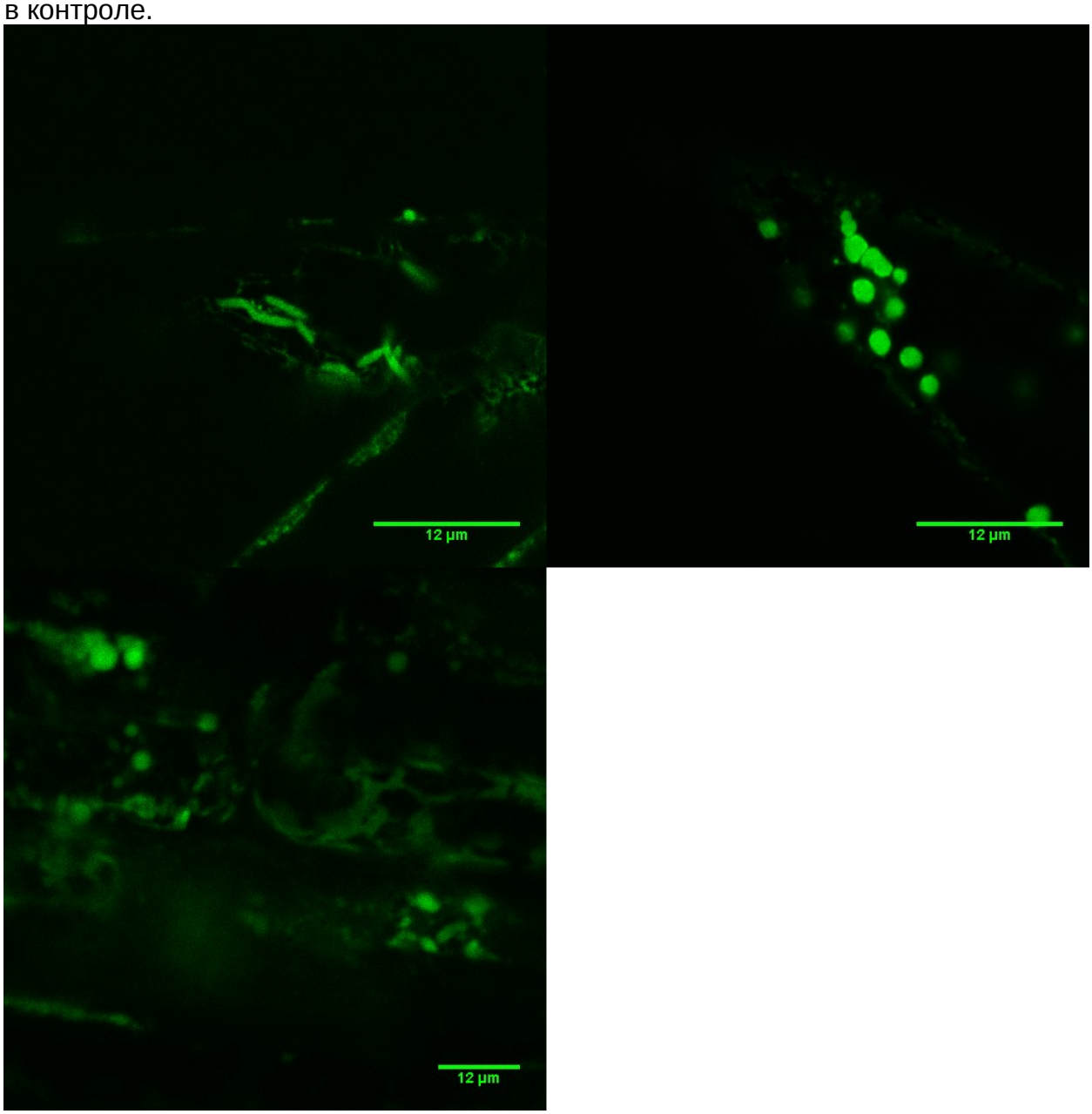

Рис. 4. ЭПР-тельца в клетках корня растений, подвергавшихся различным стрессовым воздействиям. Слева сверху – несмертельное акклимирующее тепловое воздействие (фото через 40 минут после воздействия), справа сверху – смертельное тепловое воздействие без акклимации (фото через 30 минут после воздействия), слева снизу – смертельное солевое воздействие. Конфокальный микроскоп. Фото с солевым воздействием: Е.С. Глаголева.

Обсуждение

Отсутствие различий в приросте корней и содержании хлорофилла в мутантах и в растениях дикого типа позволяет заключить, что мутант выказывает такую же эффективность кратковременной тепловой акклимации, что и дикий тип. Однако мы обнаружили разницу в содержании хлорофилла b и обоих хлорофиллов вместе в пересчёте на одно растение между мутантными растениями и растениями дикого типа в контрольной чашке. Впрочем, эта разница объясняется неравномерной посадкой и недостаточным для хорошей статистики объёмом

данных, использовавшимся при статистических тестах. В данном случае в статистическом тесте использовалось 2 чашки, то есть 8 кучек с растениями. И если растений дикого типа в кучках было 13, 16, 22 и 24, то растений-мутантов было 7, 9, 13 и 11. Поскольку кучки более-менее одного размера, в кучках с диким типом растения сильнее конкурировали за свет, и хлорофилла в пересчёте на одно растение вырабатывалось меньше.

Нельзя объяснить таким же образом зависимости удлинения корней от числа растений в кучке, полученные нами для некоторых выборок. Эти зависимости хоть и слабы, но достоверны и получены на большом статистическом материале, и поэтому их необходимо объяснить. Отрицательную зависимость удлинения корней от числа растений в кучке среди кучек с растениями дикого типа в контрольных чашках мы наблюдаем снова из-за усиленной конкуренции среди растений именно этой группы (поскольку у неё самое большое среднее значение числа растений в кучке – 18,5). Положительная зависимость тех же параметров друг от друга, которую мы наблюдаем в кучках с мутантными растениями в экспериментальных чашках Петри, может быть объяснена сотрудничеством между растениями в кучке до определённой их в ней численности. Однако количественных данных для подтверждения этой версии нет, это может стать темой для будущего исследования.

Отсутствие различий в работе механизмов кратковременной тепловой адаптации у мутанта с нерабочим белком ЭПР-телец MEB1 по сравнению с диким типом не означает отсутствие участия ЭПР-телец в работе механизмов тепловой акклимации. Необходимы новые исследования с другими белками ЭПР-телец с внесением некоторых поправок в разработанную нами методику для точного установления наличия или отсутствия у ЭПР-телец данной функции. Необходим больший статистический материал для более точного выявления статистически достоверных закономерностей и различий. Метод высадки семян путём взвешивания их в агар-агаре оказался недостаточно эффективным, в будущем семена надо будет сажать другим способом и в равных количествах. Необходимо исследовать роль ЭПР-телец в работе механизмов не только в развитии не только кратковременной, но и долговременной теплоустойчивости.

Наше нововведение по сравнению с предыдущими исследователями – измерение удлинения корней вместо удлинения гипокотиля – оказалось хорошим способом количественной оценки воздействия теплового шока на растения. Однако в будущем лучше проводить исследования на более молодых растениях, поскольку в таком случае корневые волоски будут меньше затруднять процесс измерения.

Увеличенный объём ЭПР-телец в растениях, подвергавшихся тепловому шоку без предварительной акклимации, а также потерю ими эллипсоидной формы можно объяснить их слиянием друг с другом в ходе ответа на тепловой шок. Слияние ЭПР-телец друг с другом уже отмечалось ранее в ходе ответа растения на смертельный абиотический стресс (Hayashi et al., 2001). Форма ЭПР-телец, образующаяся в результате соляного стресса, внешне похожа на ЭПР-тельца, которые наблюдали мы. Они различаются в размерах, однако это можно объяснить разной степенью готовности клетки к гибели в разных экспериментах. Далее эти ЭПР-тельца сливались с вакуолью, этим можно объяснить их отсутствие в большинстве клеток корня через 60 минут после теплового шока. Возможно, в случае смертельного теплового воздействия мы наблюдаем процесс,

аналогичный проходящему при смертельном соляном стрессе. В таком случае такое изменение формы и размера ЭПР-телец служит дополнительным подтверждением гипотезы о том, что ЭПР-тельца являются «взведённым курком», позволяющим клетке перед смертью быстро образовать из веществ-предшественников в вакуоли биологически активные соединения, доставив в вакуоль протеазы и гликозидазы в обход аппарата Гольджи. А удлинённые ЭПР-тельца в клетках, подвергавшихся несмертельному акклимирующему температурному воздействию, могут быть промежуточной стадией между ЭПР-тельцами в отсутствие стресса и ЭПР-тельцами, готовыми слиться с вакуолью при гибели клетки.

Выводы

1) Через 30 минут после смертельного теплового воздействия без акклимации ЭПР-тельца в клетках корня *A. thaliana* сливаются друг с другом, прекращают движение и приобретают шарообразную форму. Через 60 минут после теплового шока ЭПР-тельца исчезают в большинстве клеток. При несмертельном тепловом воздействии в клетках учащаются случаи слияния ЭПР-телец друг с другом и образования удлинённых ЭПР-телец.
2) Механизмы кратковременной тепловой акклимации у *A. thaliana* дикого типа и у мутанта по гену мембранного белка ЭПР-телец MEB1 работают с одинаковой эффективностью.

Благодарности

Я благодарю своего научного руководителя Татьяну Николаевну Бибикову за помощь в проведении эксперимента и написание работы в любое время дня и ночи, Сергея Менделевича Глаголева за организацию лабораторной практики Московской Гимназии на Юго-Западе №1543, Елену Алексеевну Лабунскую за помощь в освоении лабораторного оборудования, Елену Сергеевну Глаголеву за помощь при проведении измерений и за предоставленные фотографии, коллектив сотрудников кафедры физиологии растений биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова за доверие и дружелюбие, Елизавету Константиновну Секретову за помощь при обработке данных.

Приложения

	c_a	c_b	c_{a+b}	c_a/c_b	$c_a/n_{сем.}$	$c_b/n_{сем.}$	$c_{a+b}/n_{сем.}$
SAT мутанты и wt	0,6857	0,8857	0,6857	0,6857	0,6857	0,4857	0,4857
Con мутанты и wt	0,3429	0,6857	0,3429	0,6857	0,3429	0,0286	0,0286
SAT центр и край	0,6857	0,4857	0,6857	1	0,3429	0,4857	0,3429
Con центр и край	0,8857	0,3429	0,6857	0,3429	0,2	1	0,4857

Прил. 1. Значения p-value для тестов Вилкоксона для различных выборок и параметров выборок. По вертикали отложены сравниваемые выборки, по горизонтали – критерии сравнивания.

Con – контрольные чашки Петри, SAT – экспериментальные, wt – дикий тип, c_a – содержание хлорофилла a, c_b – содержание хлорофилла b, $n_{сем.}$ – число семян в кучке.

Литература

1) Nakano R.T., Yamada K., Bednarek P., Nishimura M., Hara-Nishimura I. ER bodies in plants of the Brassicales order: biogenesis and association with innate immunity // Frontiers in Plant Science. 2014. Vol. 5, №73. 17 p.
2) Hayashi Y., Yamada K., Shimada T., Matsushima R., Nishizawa N.K., Nishimura M., Hara-Nishimura I. A proteinase-storing body that prepares for cell death or stresses in the epidermal cells of Arabidopsis // Plant Cell Physiology. 2001. Vol. 42 (9). pp. 894-899.
3) Yamada K., Nagano A.J., Nishina M., Hara-Nishimura I., Nishimura M. Identification of two novel endoplasmic reticulum body-specific integral membrane proteins // Plant Physiology. 2013. Vol. 161 (1). pp. 108-120.
4) Kilian J., Whitehead D., Horak J., Wanke D., Weinl S., Batistic O., D'Angelo C., Bornberg-Bauer E., Kudla J., Harter K. The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses // The Plant Journal. 2007. Vol. 50 (3). pp. 347-363.
5) Kim J.Y., Park S.J., Jang B., Jung C.H., Ahn S.J., Goh C.H., Cho K., Han O., Kang H. Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein 2 in Arabidopsis thaliana under abiotic stress conditions // The Plant Journal. 2007. Vol. 50 (3). pp. 439-451.
6) Ludwig-Müller J., Krishna P., Forreiter C. A glucosinolate mutant of Arabidopsis is thermosensitive and defective in cytosolic Hsp90 expression after heat stress // Plant Physiology. 2000. Vol. 123 (3). pp. 949-958.
7) Larkindale J., Mishkind M., Vierling E. Plant responses to high temperature. In: Plant Abiotic Stress. Blackwell Publishing, Iowa U.S.A., 2005. pp. 100-144.
8) Физиология растений: учебник для студ. Вузов / Н.Д. Алехина, Ю.В. Балнокин, В. Ф. Гавриленко и др.; под ред. И.П. Ермакова. – 2-е изд., испр. – М.: Издательский центр «Академия», 2007. – 640 с.
9) Charng YY., Liu HC., Liu NY., Hsu FC., Ko SS. Arabidopsis Hsa32, a novel heat shock protein, is essential for acquired thermotolerance during long recovery after acclimation // Plant Physiology. 2006. Vol. 140 (4). pp. 1297–1305.
10) Hong SW., Vierling E. Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress // PNAS. 2000. Vol. 97, №8. pp. 4392–4397.
11) Yeh CH., Kaplinsky L.J., Hu C., Charng YY. Some like it hot, some like it warm: phenotyping to explore thermotolerance diversity // Plant Sci. 2012. Vol. 195, pp. 10-23.
12) Wintermans I.F., de Mots A. Spectrophotometer characteristics of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol // Biochimica et Biophysica Acta. 1965. Vol. 109 (2). pp. 448-453.
13) R: a language and environmemt for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing [Electronic resource]. 2013. Режим доступа: http://www.R-project.org