

СОДЕРЖАНИЕ

Том 69, номер 1, 2022

ОБЗОРЫ

Сигнальные пути регуляции экспрессии генов альтернативной оксидазы растений <i>Е. В. Гармаш</i>	3
Разнообразие типов диацилглицерин ацилтрансфераз растений и особенности их функционирования, или сколько DGAT нужно растениям <i>О. С. Павленко, Ю. В. Акашкина, А. В. Сухорукова, Р. А. Сидоров, В. Д. Цыдендамбаев</i>	20
Доступный арсенал систем CRISPR/CAS для геномного редактирования растений <i>Е. В. Михайлова, Э. А. Хуснутдинов, А. В. Чемерис, Б. Р. Кулуев</i>	38
Нитратный сигналинг в растениях. Эволюционные аспекты <i>А. В. Никитин, С. Ф. Измайлов</i>	54

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Структура хлоренхимы и липидный профиль мембран в листьях галофитов сем. <i>Cheporodiaceae</i> с разным типом фотосинтеза <i>О. А. Розенцвет, Е. В. Шуйская, Е. С. Богданова, В. Н. Нестеров, Л. А. Иванова</i>	68
Взаимодействие апопластных пероксидаз из корней пшеницы с нитритом и нитратом: интермедиаты и продукты <i>Е. И. Галеева, Л. В. Викторова, О. П. Гурьянов, А. А. Суханов, А. В. Часов, Ф. В. Минибаева</i>	80
Мутация гена <i>ARA7/AtRabF2b</i> , увеличивающая содержание белка ARA7, вовлеченного в регуляцию эндоцитоза, повышает солеустойчивость растений <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. <i>О. В. Сергиенко, Л. А. Халилова, Ю. В. Орлова, А. В. Шувалов, Н. А. Мясоедов, И. В. Карпычев</i>	88
Жизненный цикл двух токсикогенных видов Bacillariophyta: <i>Pseudo-nitzschia calliantha</i> Lundholm, Moestrup et Hasle и <i>P. pungens</i> (Grunow ex P.T. Cleve) Hasle <i>С. Л. Полякова, Н. А. Давидович, И. В. Стоник, Т. Ю. Орлова</i>	105

УДК 581.1

СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ АЛЬТЕРНАТИВНОЙ ОКСИДАЗЫ РАСТЕНИЙ¹

© 2022 г. Е. В. Гармаш*

Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения
Российской академии наук, Сыктывкар, Россия

*e-mail: garmash@ib.komisc.ru

Поступила в редакцию 28.04.2021 г.

После доработки 01.06.2021 г.

Принята к публикации 07.06.2021 г.

В обзоре рассмотрены актуальные вопросы регуляции терминальной альтернативной оксидазы митохондрий растений (АО), являющиеся предметом современных исследований и дискуссий. АО обеспечивает транспорт электронов по альтернативному нефосфорилирующему цианидустойчивому пути в митохондриальной ЭТЦ (ЭТЦ) и играет важную роль в поддержании окислительно-восстановительного баланса клетки и защите от стресса. Основные сведения по сигналингу АО получены в работах по изучению экспрессии гена *AOX1a Arabidopsis thaliana (AtAOX1a)*. Проанализирована информация об экспрессии *AOX* у различных видов растений. Описаны механизмы транскрипционного и посттранскрипционного контроля экспрессии генов *AOX*. Рассмотрена роль некоторых *cis*-регуляторных элементов промотора *AtAOX1a* и связанных с ними транскрипционных факторов. Показано, что трансдукция сигнала, вызывающего экспрессию генов *AOX*, может происходить по anterogradному и retrogradному пути. Приведены сведения о митохондриальной retrogradной регуляции АО, АФК-зависимых и АФК-независимых сигнальных путях индукции экспрессии *AOX*. Дана гипотетическая последовательность сигнальных событий индукции светом экспрессии *AOX1a* в клетке листа пшеницы в процессе зеленения. Описано взаимодействие сигналинга АО с гормональными сигнальными путями и индукция *AOX* сигналами пластидного происхождения. В заключении подчеркнута, что АО интегрирована в общую сигнальную сеть клетки, являясь как мишенью, так и регулятором сигнальных событий.

Ключевые слова: альтернативная оксидаза (АО), митохондриальная retrogradная регуляция, anterogradный путь индукции генов *AOX*, *cis*-регуляторные элементы промотора, транскрипционные и посттранскрипционные механизмы экспрессии, посттрансляционная регуляция активности АО

DOI: 10.31857/S0015330322010055

ВВЕДЕНИЕ

Во внутренней мембране растительных митохондрий, наряду с основным (цитохромным) путем транспорта электронов (ЦП), присутствует альтернативный путь (АП) через терминальную оксидазу,

названную альтернативной оксидазой (АО). АО катализирует четырехэлектронное восстановление убихинолом кислорода до воды и устойчива к действию цианида. АП транспорта электронов минует два пункта генерации электрохимического градиента протонов (комплексы III и IV), а энергия окисления убихинола кислородом выделяется в виде тепла. Это снижает энергетическую эффективность дыхания, но снимает дыхательный контроль, регулирующий скорость образования АТФ и НАД·Н в зависимости от нужд клетки [1]. АП выявлен не только у высших растений, но и у представителей всех царств (кроме *Archaeobacteria*) – бактерий, водорослей, мхов, папоротников, некоторых грибов и даже животных, ведущих неподвижный или прикрепленный образ жизни (губки, актинии, нематоды, моллюски и др.) [1].

Первоначально интерес к АО был вызван ее участием в процессе термогенеза тканей цветка у некоторых представителей сем. *Araceae*. Повыше-

¹ К статье имеются дополнительные материалы, доступные для авторизованных пользователей по doi: 10.31857/S0015330322010055.

Сокращения: АО – альтернативная оксидаза, АП – альтернативный путь, МРР – митохондриальная retrogradная регуляция, МФА – монофторацетат, ПГК – программируемая гибель клеток, СВЧ – реакция сверхчувствительности, СК – салициловая кислота, ССТ – сайт старта (инициации) транскрипции, ТФ – транскрипционный фактор, хлЭТЦ – ЭТЦ хлоропластов, ЦП – цитохромный путь, ЭР – эндоплазматический ретикулум, ЭТЦ – ЭТЦ митохондрий, *AOX* – гены АО, CARE(s) – *cis*-регуляторные элементы (Cis-Active Regulatory Element(s)), РТР – митохондриальная пора проницаемости (Permeability Transition Pore), SNP – однонуклеотидный полиморфизм (Single Nucleotide Polymorphism), UCP – разобщающие белки, UQ – убихинон, 3'-UTR – 3'-нетранслируемая область (3'-UnTranslated Region).

ние температуры термогенных тканей способствует испарению соединений, привлекающих насекомых-опылителей. Этот феномен описан еще в XVIII веке Ламарком, а цианидрезистентное дыхание было открыто в 30-х гг. XX века [2]. Нефосфорилирующая особенность АП в течение долгого времени вызвала вопросы о функции АП в нетермогенных тканях. Обсуждению природы, механизмов регуляции и физиологического значения АО в растениях посвящено немало обзоров [1, 3–7]. К настоящему времени большинство исследователей сходятся во мнении, что на клеточном и биохимическом уровне вовлечение АП способствует поддержанию окислительно-восстановительного баланса в митохондриальной ЭТЦ за счет более быстрого окисления НАДН и предотвращает генерацию избыточного количества АФК. Это влияет на метаболизм не только митохондрий, но и клетки в целом. Признано, что роль АО заключается в обеспечении метаболической пластичности клетки и растения в изменяющихся условиях среды [6].

Исследование альтернативного пути дыхания вышло из рамок только фундаментальной проблемы. Альтернативную оксидазу предложено использовать в качестве функционального маркера репрограммирования клетки (“cell reprogramming”) при стрессе в селекции генотипов с высокой продуктивностью и устойчивостью [8], для выявления реакции растений в ответ на изменение условий среды (глобальное потепление, увеличение CO₂ в атмосфере) [9], в борьбе с митохондриальными заболеваниями человека [10]. За последние два десятилетия благодаря применению современных физико-химических и молекулярно-генетических методов достигнут значительный прогресс в исследовании структуры белка, генов и функций АО. Полагают, что АО является не только мишенью, но и регулятором стресс-сигнала [11]. Вместе с тем, исследование различных аспектов сигналинга АО на молекулярном уровне пока только начинаются [1, 7, 12, 13].

В настоящем обзоре приведены известные к настоящему времени сведения о генах АО, сигнальных путях и механизмах индукции их экспрессии, интеграции сигналинга АО с другими клеточными сигнальными путями; проанализирована роль АО в поддержании сигнальных внутриклеточных взаимодействий; обсуждаются механизмы посттрансляционных модификаций белка АО. В обзор также включены собственные экспериментальные данные, свидетельствующие об участии АО в модуляции митохондриальной функции.

ГЕНЫ АО И ИХ ПОЛИМОРФИЗМ

У двудольных растений АО кодируется двумя подсемействами ядерных генов — *AOX1* и *AOX2*, у однодольных — одним подсемейством *AOX1* [14], за

исключением некоторых представителей древней, рано дивергировавшей группы сем. *Araceae* [15]. Образование двух подсемейств и варьирование количества генов, по-видимому, является результатом дупликации и дивергенции [14, 15]. *AOX2* присутствует в водорослях и голосеменных растениях, но не найден во мхах, папоротниках и плаунах. В геноме грибов обнаружен ген *AOX* только одного из двух подсемейств. *Arabidopsis thaliana* содержит четыре гена *AOX1(a–d)* и один *AOX2*, соя *Glycine max*, напротив, — один ген *AOX1* и два гена *AOX2(a, b)* [14]. Рис содержит четыре гена *AOX1(a–d)* [14], а у пшеницы идентифицированы только гены *AOX1a* и *AOX1c* [16], хотя не исключена возможность обнаружения других генов этого подсемейства — *AOX1d* и *AOX1e* [17]. Геном моркови *Daucus carota* L. уникален, он содержит два гена каждого подсемейства: *AOX1(a, b)* и *AOX2(a, b)* [18].

Большинство генов имеют консервативную интрон-экзонную организацию, состоящую из четырех экзонов, чередующихся тремя интронами. Вариации структуры генов *AOX* среди видов связаны с потерей или включением интрона [14]. Исследования индукции *AOX* на уровне транскрипции в основном проведены на растениях с секвенированным геномом — *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., *A. lyrata* L., *Nicotiana tabacum* L., *Zea mays* L. и некоторых других видах, что позволяет определить молекулярные механизмы сигналинга, регуляции активности АО и ее роль в реакции на стресс.

Гены *AOX* могут проявлять полиморфизм, как правило, связанный с однонуклеотидными заменами (SNP). SNP в *AOX* могут встречаться как в экзонах, так и в интронах [14]. SNP обнаружены в нескольких областях гена *AOX2* в трех сортах *Olea europaea* L. [19]. Найденны также полиморфные сайты *AOX* со вставкой/делецией и копированием фрагментов ДНК. В частности, полиморфизм *AOX* моркови (*DcAOX2a*) выявлен в интроне 3 [20]. Функциональное значение всех найденных SNP в *AOX* пока точно не определено. Известно, что замена Лиз (K) на Асн (N) в 96 позиции аминокислоты в белке АО арбуза была результатом SNP в единственном гене АО арбуза — *ClAOX* [21]. Как показано, этот SNP связан с локусом хозяйственно-полезных количественных признаков, отвечающих за устойчивость к гипотермии [22]. Вариации в последовательности гена АО предложено использовать как молекулярные маркеры стрессоустойчивости вида, в том числе, для селекции в растениеводстве, а также наследственной изменчивости для объяснения индивидуальных различий между растениями одного вида [8, 14]. В результате точечного мутагенеза в гене *AOX1a* риса получена однонуклеотидная замена; замена K71 на N71 в белке привела к повышению устойчивости сорта к пониженным температурам [23].

Другой аспект полиморфизма генов АО связан с микрогетерогенностью 3'-нетранслируемой области транскриптов *АОХ* (3'-UTR) в результате альтернативного полиаденилирования [14]. Модуляция длины 3'-UTR может значительно влиять на регуляцию экспрессии *АОХ*, хотя сведений об этом очень мало. В 3'-UTR *АОХ1а* кукурузы идентифицирован предполагаемый сайт связывания с микроРНК (miR163) [14, 24]. Этот сайт находится между двумя сайтами расщепления, указывая на то, что только транскрипты с достаточно длинной 3'-UTR могут подвергаться микроРНК-сайленсингу. Около половины молекул мРНК *АОХ1а* в проростках кукурузы, транскрипция которых была индуцирована обработкой H_2O_2 , имели короткие 3'-UTR без сайта связывания микроРНК и, следовательно, избегали микроРНК-сайленсинга [24]. В интроне 3 *АОХ2а* *Daucus carota* найдена повторяющаяся делеция, которая, предположительно, влияет на сайт связывания с микроРНК [20]. Множественные вариации длины 3'-UTR выявлены в *АОХ2* у разных сортов оливы (*Olea europaea* L.) [19]. Это может быть консервативным признаком среди сортов с разной способностью к укоренению черенков, которое связано со стресс-индуцируемой экспрессией *АОХ2* [19].

Хотя информация о полиморфизме генов АО пока фрагментарна, становится все более понятно, что полиморфизм *АОХ* является эволюционным механизмом регуляции экспрессии *АОХ* на различные сигналы, повышающим устойчивость растения к стрессу.

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ И ПОСТТРАНСКРИПЦИОННЫЙ КОНТРОЛЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ АО

Регуляция активности транскрипции гена в значительной степени связана со структурой его промоторной области. Наиболее полно изучены промоторы генов АО *A. thaliana* [25, 26] и *Glycine max* [27]. Ген *АОХ1а* *A. thaliana* (*AtАОХ1а*) служит моделью для изучения транскрипционного контроля экспрессии *АОХ* при стрессе [5, 26, 28].

Область промотора содержит *цис*-регуляторные элементы (CAREs), как правило, находящиеся близко к ССТ (сайт старта транскрипции). Эти элементы могут взаимодействовать с РНК-полимеразой и транскрипционными факторами (ТФ), контролирующими экспрессию генов.

Анализ промотора *AtАОХ1а* с использованием делеций и мутагенеза выявил область длиной 93 п.н. (отрезок между 313 и 406 позицией нуклеотидных оснований выше ССТ; далее все позиции выше ССТ обозначены со знаком “–”), обозначенную как регулятор экспрессии *AtАОХ1а* митохондриального ретроградного пути [13, 28]. Эта область промотора регулирует экспрессию гена при воз-

действии антимицина – ингибитора комплекса III ЭТЦ, и ингибитора ЦТК (аконитазы) – МФА (монофторацетат). Позже был выявлен CARE, обозначенный как MDM (Mitochondrial Dysfunction Motif), имеющий последовательность СТТGNNNNCA(A/C)G и регулирующий экспрессию так называемых 24 MDS-генов (Mitochondrial Dysfunction Stimulon), в том числе *АОХ1а* [29].

Анализ промотора *AtАОХ1а* длиной 1800 п.н. выше ССТ выявил 15 CAREs, из которых 12 были функционально активными (A1, A2, B2, C, D, E, F, G, H, I1, I2, J), участвующими в регуляции транскрипции гена в ответ на воздействие таких стресс-агентов как H_2O_2 и ротенон (ингибитор комплекса I ЭТЦ), либо обоих [26]. В нормальных условиях промотор *AtАОХ1а* репрессирован под контролем элемента B2 (CGTGAG, –1576 п.н.). Этот элемент является сайтом связывания с ТФ ABI4 (ABA-Insensitive 4). Полагают, что ABI4 – репрессор митохондриальной ретроградной регуляции (MPP), поскольку мутанты *abi4* имели повышенный уровень транскриптов гена [30].

CAREs A2, E, I1 и I2 функционируют как активаторы MPP. При воздействии стресс-агентов уровень репрессии снижался и наблюдалась положительная регуляторная активность других CAREs, что свидетельствует о комбинаторной природе регуляции экспрессии генов [26].

Элементы В и I содержат сайт ABRE (ABA-Responsive Element) (ACGT), а элемент I1 (ACGTG, –93 п.н.) находится в непосредственной близости к I2, формируя пару ABRE-ABRE. ABRE распознается ТФ bZIP (лейциновая молния); две копии ABRE, вероятно, обеспечивают высокую чувствительность гена к АБК [26].

CARE I1 в промоторе *AtАОХ1а* также перекрывается с фоточувствительным элементом G-box (CACGTG), что предполагает существование прямых механизмов, связывающих экспрессию гена с фотосинтетической функцией [26, 31, 32]. Сведения о фоточувствительных элементах промотора *АОХ* и светозависимом характере индукции *АОХ* приведены далее в разделе о сигнальных путях.

Генетический скрининг выявил сайты (T/G)CGTGT и W-box ((a/t)TTGAC(a/c/t)) в промоторе *AtАОХ1а*, с которыми связываются ТФ семейства NAC и WRKY соответственно [28, 33]. В *A. thaliana* ANAC017, ANAC013 и другие ANAC являются положительными регуляторами экспрессии *AtАОХ1а* [29, 34], а WRKY – как положительные, так и отрицательные регуляторы экспрессии *AtАОХ1а* [33].

Анализ промотора длиной 1000 п.н. другого гена АО – *AtАОХ1с*, не проявляющего индукцию в ответ на окислительный стресс, выявил 9 CAREs (A–I), в основном находящихся в области 500 п.н. выше ССТ [25]. Семь элементов из них присут-

ствовали и в промоторной области гена АО сои — *GmAOX2b*, который не является стресс-индуцируемым [27]. Делеции больших фрагментов и CAREs промоторов *AtAOX1c* и *GmAOX2b* показали, что элементы функционировали по-разному, проявляя как негативную, так и позитивную регуляцию экспрессии генов в зависимости от тестируемой ткани и сигналов. Например, все элементы промотора *AtAOX1c*, кроме С (–342 п.н.), проявляли в линии $\Delta At2g19080$ (с повышенным уровнем транскриптов *AOX1c* и белка АО) положительную регуляцию экспрессии, тогда как в суспензии клеток и листьях растений *A. thaliana* экотипа Col-0 некоторые элементы, в частности Е (–230 п.н.), функционировали как негативные регуляторы [25]. Полногеномный анализ на основе программы Expression Angler и АСТ выявил общие функциональные элементы в промоторе *AtAOX1c* и генов, экспрессия которых связана с процессами деления и роста клеток. Это дало основание полагать, что экспрессия *AtAOX1c* регулируется сигналами, связанными с ростом и развитием [25].

Проведенный нами анализ промоторов всех генов *AtAOX* выявил во всех генах общие CAREs, участвующие в обеспечении чувствительности к стрессам разной природы [35, 36]. G-box (CACGTG) присутствует в промоторе не только *AOX1a*, но и *AOX2* [36]. Гены *AOX1a*, *AOX1c* и *AOX1d* обогащены в промоторах такими CAREs, как MYB4-BSM (Binding Site Motif), SORLEP3, SORLIP2 и CCA1-BSM, что указывает на зависимость их экспрессии от изменений функционирования хлЭТЦ (ЭТЦ хлоропластов) на свету. В *A. thaliana* CCA1-BSM может участвовать в регулируемой фитохромом экспрессии генов LHCB, кодирующих хлорофилл *a/b*-связывающие белки [37]. Полная последовательность UVBox^{ANAC13} (CCAAGG), участвующего в обеспечении высокой чувствительности к УФ-В [38], обнаружена в генах *AOX1a* и *AOX1c* [35]. При этом промоторы всех генов *AOX1* содержали укороченную версию этого элемента (CCAAG), свойственную генам с более поздним (по сравнению с генами, имеющими полную последовательность UVBox^{ANAC13}) характером УФ-В-индуцируемой экспрессии [38]. Светочувствительные CAREs, так называемые MRE^{CHS}-like box и ACE^{CHS}-like box, найдены в промоторах всех генов *AtAOX*, за исключением *AOX1b* [35], и в большом количестве содержатся в промоторах УФ-индуцируемых генов, таких как *CHS* (ген халкон-синтазы) [38]. Наличие общих CAREs указывает на комплементарный характер взаимодействия генов *AtAOX* на транскрипционном уровне в определенном диапазоне ответа на стресс. Так, при действии повышенной физиологически допустимой дозы УФ-В и умеренного уровня освещенности (400 мкмоль/(м² с)) антисмысловые по *AOX1a* растения *A. thaliana* проявляли компенсаторную индукцию экспрес-

сии других генов АО [35, 36]. Вместе с тем, активность генов АО, в частности, при действии повышенной освещенности, скорее всего, регулировалась по разным сигнальным путям. На это указывал кластерный анализ, который выделил гены АО в разные кластеры в зависимости от характера их экспрессии [36].

Механизмы посттранскрипционного контроля экспрессии генов АО, связанные с процессингом РНК, изучены слабо. Первые сведения о регуляции генов АО на посттранскрипционном уровне появились в работе по изучению экспрессии *SgAOX* в початках *Sauromatum guttatum* [39]. Было обнаружено многократное усиление экспрессии гена при отсутствии изменения скорости транскрипции в изолированных ядрах. Полагают, что помимо альтернативного полиаденилирования, выявленного в нескольких генах АО [14], в процессинге РНК АО велика роль эспирования, связанного с фосфорилированием 5'-конца транскрипта и присоединением через трифосфатный мостик 7-метилгуанозина (кэп-структуры) [40]. В животных клетках эспирование частично регулируется мишенью рапамицина (TOR) — протеинкиназы серин-треониновой специфичности. TOR есть у всех эукариот. TOR в составе мультимолекулярных сигнальных комплексов (у животных и дрожжей их два, у растений только один) регулирует клеточный рост и выживание, активируя быстрый синтез белка, что особенно важно при стрессе. В растениях *A. thaliana* TOR может служить акцептором протеинкиназы KIN10, возможно, через посредника в ядре — циклинзависимой киназы E1 (CDKE1), индуцирующей экспрессию *AOX1a* [40].

ПАТТЕРНЫ ЭКСПРЕССИИ И ТРИГГЕРЫ АКТИВАЦИИ АОХ

Экспрессия генов АО стала интенсивно изучаться после клонирования первой кДНК *AOX* из *Sauromatum guttatum* [41]. К настоящему времени получено много информации о характере экспрессии *AOX* у различных видов. Показано, что экспрессия *AOX* может быть конститутивной в процессе роста и развития, а в условиях стресса — сильно меняться [5, 14, 42]. Ортологичные гены, как правило, проявляют одинаковый характер экспрессии, например, *Aox2a* и *Aox2b* сои и вигны китайской [43]. Однако есть и противоположные примеры. Ортологичные гены *AOX1a* и *AOX1c* пшеницы и риса проявляли разный характер экспрессии в процессе зеленения листа [44, 45].

Индукция экспрессии *AOX* выявлена при воздействии абиотических и биотических факторов — температуры [46, 47], засоления [48], засухи [49], гипоксии [50], высокой освещенности [31, 36, 51, 52], УФ-В облучения [35], тяжелых металлов [52, 54], озона [55], дефицита азота [56], патогенов [57] и других видах стресса [52, 58]. Некоторые имею-

щиеся в литературе сведения об экспрессии *АОХ* высших растений обобщены в Дополнительных материалах (таблица 1), из которой видно, что гены *АО* проявляют дифференциальный характер экспрессии, паттерны экспрессии одного и того же гена *АО* могут зависеть от типа ткани, условий роста, продолжительности действия стресс-фактора.

Гены подсемейства *АОХ1*, как правило, стресс-индуцируемые. *АОХ1a A. thaliana* наиболее чувствителен к стрессу, но у других видов растений этот ген может и не проявлять подобную реакцию (Дополнительные материалы, таблица 1). Экспрессия *АОХ2* чаще регулируется процессами роста и развития, что не исключает вовлечение *АОХ2* в ответы на действие стрессоров. В частности, экспрессия всех четырех генов обоих подсемейств *АОХ* у *Daucus carota* имела дифференциальный орган- и рост-специфичный характер [18]. Ген *DcАОХ1a* проявлял более выраженный конститутивный характер экспрессии в листе и в процессе образования *de novo* вторичной флоэмы корня эксплантов. Известными триггерами индукции генов *АОХ* являются дисфункции митохондрий, вызванные как действием ингибиторов ЭТЦ [28, 51], так и мутациями генов, кодирующих митохондриальные белки комплексов ЭТЦ [59, 60]. Полагают, что дефекты ЭТЦ вследствие мутаций генов и ингибиторы ЭТЦ и ЦТК формируют редокс-сигналы, которые передаются в ядро и индуцируют экспрессию *АОХ* и других, не только “дыхательных”, генов [26, 28, 60]. Экспрессия *АОХ* (на примере *AtАОХ1a*) – широко используемая модель в изучении митохондриального ретроградного сигналинга.

Таким образом, дифференциальный характер экспрессии генов *АОХ* связан с генотипическим и фенотипическим разнообразием клеток, регулирующей активностью генов в зависимости от поступающих сигналов, контролем экспрессии *АОХ* на разных уровнях реализации наследственной информации. Это обеспечивает пластичность метаболизма растительной клетки, в которую вовлечена энергодиссипирующая функция митохондрий [5, 8, 14, 34].

СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ *АОХ*

Трансдукция сигнала, вызывающего экспрессию *АОХ*, может происходить по антероградному и ретроградному путям [11, 13, 30]. Антероградная регуляция экспрессии генов представляет собой нисходящий (top-down) путь от ядра к органелле. Ретроградная регуляция направлена по восходящему (bottom-up) пути от органелл к ядру [12, 61]. Принято считать, что антероградный сигналинг протекает на нескольких уровнях – от транскрипционных до посттрансляционных; сигналы, как правило, связаны с процессами роста и развития

растений, и действием внешних факторов. Ретроградная регуляция экспрессии генов происходит в ответ на изменение условий внутренней среды и позволяет органеллам влиять на экспрессию ядерных генов [12, 30, 61].

Митохондриальная ретроградная регуляция экспрессии *АОХ*. Наиболее полно описана митохондриальная ретроградная регуляция (МРР-путь) экспрессии *АОХ*, подтверждением существования которого являются не только данные об индукции экспрессии *АОХ* ингибиторами ЭТЦ, ЦТК и вследствие дефектов комплексов ЭТЦ, но и наличие в промоторе *АОХ* (на примере *AtАОХ1a*) МРР-участка, необходимого для индукции экспрессии гена [28, 34]. Ингибиторы – антимицин и монофторацетат – имитируют соответственно АФК-зависимый и АФК-независимый сигнальные пути индукции экспрессии генов *АО* [11, 13, 28].

Дисфункции в ЭТЦ, связанные с нарушением потока электронов, приводят к образованию избыточного количества АФК – супероксид-радикала ($O_2^{\cdot-}$) и перекиси водорода (H_2O_2). Местом генерации $O_2^{\cdot-}$ являются комплексы I, II и III, а донором электронов для кислорода – убисемихиновый интермедиат [13]. Образующийся в ЭТЦ $O_2^{\cdot-}$ нестабилен (время жизни – 10^{-12} с) и быстро нейтрализуется в H_2O_2 при участии Mn-зависимой супероксиддисмутазы (MnSOD), а также спонтанно. Показано, что сверхэкспрессия *MnSOD* снижала экспрессию *АОХ1a* и *АОХ1b* при воздействии холодового стресса в растениях риса [62], а нокаутная по *MnSOD* линия *Arabidopsis thaliana* проявляла усиление экспрессии *АОХ1a* в ответ на обработку $AlCl_3$ по сравнению с линией дикого типа [63]. Эти данные свидетельствуют о том, что содержание АФК в митохондриях, тесно связанное с активностью MnSOD, может быть первичным сигналом, индуцирующим МРР-зависимую индукцию экспрессии *АОХ*. H_2O_2 является вторичным мессенджером АФК-зависимой МРР-экспрессии *АОХ* [13].

Ранее считалось, что H_2O_2 индуцирует экспрессию *АОХ* путем прямого окисления или модулирования процессов фосфорилирования ТФ, контролируя инициацию транскрипции [64]. Однако стало известно, что антимицин – ингибитор комплекса III – вызывал более быструю индукцию экспрессии *АОХ1* в клетках табака, чем экзогенная перекись, накапливающаяся во внутриклеточном пространстве [65]. Это дало основание полагать, что АФК митохондриального происхождения более эффективны в индукции экспрессии *АОХ1*, чем АФК цитоплазмы или хлоропластов. В этой работе было также показано, что бонгкрековая кислота, ингибитор митохондриальной поры проницаемости (РТР), участвующей в запуске апоптоза у

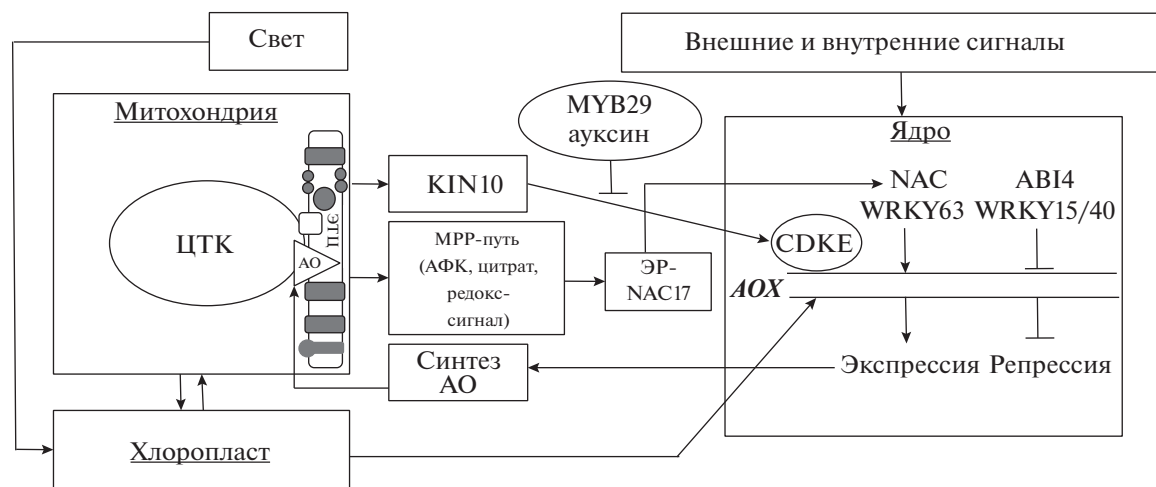


Рис. 1. Схема сигнальных путей регуляции экспрессии генов *AOX*. Внешние и внутренние (митохондриальные и плазмидные) сигналы поступают в ядро для активации *AOX* (на основе схем, представленных в работах [1, 5, 12]). Путь митохондриальной ретроградной регуляции экспрессии *AOX* (MPP-путь) (на примере *AOX1a Arabidopsis thaliana*, *AtAOX1a*) включает поступление сигнала из митохондрий (АФК, цитрат, редокс-сигнал) с последующим высвобождением транскрипционного фактора (ТФ) семейства NAC (NAC17) из эндоплазматического ретикулума (ЭР), который (как и другие ТФ NAC) является положительным регулятором экспрессии *AtAOX1a*. ABI4 – репрессор *AtAOX1a*. ТФ WRKY могут быть как положительными (WRKY63), так и отрицательными (WRKY15/40) регуляторами экспрессии *AOX1a*. Другой путь трансдукции сигнала включает активацию протеинкиназы (KIN10), которая взаимодействует с медиаторным в ядре комплексом CDKE1, индуцирующим *AOX1a*. Ауксин и ТФ MYB29 – негативные регуляторы экспрессии *AOX1a*.

животных, блокировала антимицин-, H_2O_2 и СК-зависимую индукцию *AOX1*. Поэтому возникла альтернативная гипотеза, объясняющая АФК-зависимую индукцию экспрессии *AOX*, которая построена на аналогии запуска процесса программируемой гибели клетки (ПГК) у животных [65, 66]. АФК, в частности перекись, накапливающаяся при стрессе во внутриклеточном пространстве и способная легко проникать через клеточные мембраны, может вызывать дисфункции митохондрий и открытие митохондриальных пор (РТР), что сопровождается диссипацией мембранного потенциала и является решающим этапом сигналинга индукции *AOX* [65, 66]. Полагают, что временное открытие РТР – важный механизм клеточного редокс-сигналинга и способ коммуникации митохондрий с ядром [65].

NAC-содержащие ТФ (ANAC017, ANAC013) являются прямыми активаторами транскрипции *AOX1a* [29, 34] (рис. 1). ANAC017 – конститутивно экспрессируемый ТФ, связанный с эндоплазматическим ретикулумом (ЭР) через С-концевой трансмембранный домен. В ответ на антимицин или при митохондриальных дисфункциях происходит протеолитическое отщепление С-концевого домена ромбовидной протеазой, а N-концевой домен высвобождается из ЭР и мигрирует в ядро, связываясь с промотором *AOX1a*. В ANAC017 обнаружен сайт расщепления ромбовидной протеазой между двумя доменами, а ингибиторы ромбовидной протеазы снижают индуцируемую антимици-

ном экспрессию *AOX1a* [34]. Предполагается, что ромбовидная протеаза активируется H_2O_2 митохондриального происхождения, так как мутанты ANAC017, как правило, не проявляют экспрессию *AOX1a* при обработке экзогенной H_2O_2 . ANAC017 непосредственно связывается с сайтом (T/G)CGT-GT промотора *AtAOX1a* и может активировать другие ТФ семейства NAC, например, ANAC013, являющимися положительными регуляторами экспрессии *AOX1a*. Однако другие ТФ NAC не могут компенсировать отсутствие ANAC017 [29].

Промотор *AtAOX1a* находится под контролем разных ТФ, напрямую взаимодействующих с регуляторными элементами и влияющих на экспрессию *AtAOX1a* [5]. Выявлено, что WRKY связываются в трех сайтах W-box (–291, –373 и –412 п.н.) промотора *AtAOX1a*. WRKY15 и WRKY40 являются репрессорами ретроградной экспрессии *AOX1a* и двух других ядерно-кодируемых генов митохондриальных белков *A.thaliana* – *NDB2* (гена “внешней” НАДФ·Н-дегидрогеназы) и *UPOX* (UP-regulated by Oxidative stress), чувствительных к окислительному стрессу [33]. Но если ABI4 – репрессор *AOX1a* в нормальных условиях, то WRKY15 и WRKY40 ограничивают экспрессию *AOX1a* в условиях дисфункции ЭТЦ, в частности, при обработке антимицином. Предположительно, WRKY63 функционирует как активатор экспрессии *AOX1a*. Установлено, что WRKY63 участвует в реакции на высокую освещенность [33]. Авторы полагают, что WRKY40 и WRKY63 конкурируют за сайты

связывания с промотором гена. Показано, что ауксин и ТФ MYB29 – это негативные регуляторы экспрессии *AtAOX1a*, функционирующие через гормональные сигнальные пути и взаимодействующие с ТФ ERFs (Ethylene Response Factors) и WRKY [30, 67].

Трансдукция сигнала из митохондрий также может идти по пути активации протеинкиназы KIN10, которая взаимодействует с CDKE1, являющейся в ядре частью медиаторного комплекса, индуцирующего *AOX1a* [40]. В исследованиях на *rao1* мутантах выявлено, что CDKE1 участвует в восприятии любых клеточных сигналов, в том числе, антероградного происхождения (например, вызываемых накоплением H_2O_2 , холодовым воздействием) с последующей индукцией *AOX1a*.

Разделение АФК-зависимого и АФК-независимого путей МРР-сигналинга *AOX* условно, поскольку АФК является потенциальной молекулой в трансдукции сигнала, получаемого из митохондрий вследствие ингибирования как антимицином, так и МФА [28]. Генерация АФК обнаружена в клетках суспензии табака при воздействии на них 5 мМ МФА [68]. Однако это не исключает возможность передачи сигнала к промоторной области [13, 28]. На это указывает тот факт, что разные концентрации МФА, регулирующие экспрессию *AOX*, могут по-разному влиять на образование АФК, вплоть до отсутствия эффекта [28]. Показано также, что ТФ WRKY участвует как в антимицин-, так и в МФА-зависимой индукции *AtAOX1a* по МРР-пути, однако мутанты в области W-бокса сильнее реагировали экспрессией *AOX1a* на антимицин, чем на МФА.

Помимо H_2O_2 , другими сигнальными молекулами, участвующими в регуляции экспрессии *AOX*, являются NO, салициловая кислота (СК), жасмоновая кислота, этилен, ионы Ca^{2+} [12, 13]. Хорошо известен эффект накопления H_2O_2 , NO и СК, а также увеличение экспрессии *AOX1a* и содержания белка АО в процессе развития реакции сверхчувствительности (СВЧ) растений в ответ на атаку патогена [57]. Развитие СВЧ – хорошая модель изучения сигнальных путей, однако до сих пор все этапы этих путей не расшифрованы. Показано, что генерация супероксидного взрыва ($O_2^{\cdot-}$ burst) в ответ на инокуляцию *Nicotiana tabacum* бактериями-патогенами зависела от наличия *AOX1a* в геноме растения [57]. Именно генерация $O_2^{\cdot-}$ в митохондриях инициировала реакцию СВЧ, хотя другие АФК также участвовали в ее развитии. Отсутствие *AOX1a* приводило к задержке $O_2^{\cdot-}$ взрыва, колоколизации NO, ONOO⁻ (пероксинитрита – продукта взаимодействия $O_2^{\cdot-}$ и NO) и развития реакции СВЧ в ответ на внедрение патогена так же, как и влияние антимицина,

ингибирующего комплекс III. Однако позже (по сравнению с диким типом) происходил резкий супероксидный взрыв. ONOO⁻ участвует в нитровании тирозиновых остатков белков, что влияет на их модификацию, чувствительность к протеазам и развитие ПГК. Сверхэкспрессия *AOX1a*, напротив, предотвращала развитие супероксидного взрыва, вызываемого действием антимицина. Сделано предположение, что электронный транспорт, очевидно на уровне комплекса III, является мишенью реакции, вызывающей сигнал для развития СВЧ, а АOX – ключевая детерминанта митохондриальной динамики АФК в ответ на атаку патогена [57, 66]. Причиной супероксидного взрыва на ранних этапах развития СВЧ является скоординированное совместное подавление экспрессии генов и активности АО и MnSOD.

Усиление экспрессии *AOX1a* как защитная ответная реакция на биотический стресс, скорее всего, связано с влиянием СК. В низких концентрациях (менее 1 мМ) СК как аналог хинона взаимодействует с комплексом I и II, нарушая транспорт электронов в ЭТЦ, что инициирует сигнальные пути, приводящие к экспрессии генов АО [66]. Вместе с тем, СК индуцирует экспрессию *AOX* не напрямую через ТФ, связывающиеся с промотором гена (СК-чувствительный элемент as1 отсутствует в промоторе *AtAOX1a*), а скорее всего посттранскрипционно [26]. Полагают, что EDS1 (Enhanced Disease Susceptibility 1) и PAD4 (Phytoalexin Deficiency 4) – липазоподобные белки, контролирующие СВЧ-ответ, накопление СК и СК-зависимый сигналинг, но функционирующие в upstream-части СК-сигналинга, регулируют экспрессию *AOX1a* (показано на примере *AtAOX1a*). Возможно, что EDS1/PAD4-сигнальный путь является уникальным в индукции экспрессии *AOX1a*; это объясняет, в частности, причину отсутствия в некоторых случаях коэкспрессии *AOX1a* с *NDB2* при действии H_2O_2 или ротенона – триггеров запуска МРР-пути [26].

Белки EDS1 и PAD4 как посредники участвуют в трансдукции сигнала ПГК, обусловленного активацией Toll-подобных рецепторов иммунного ответа [69]. Известно, что АО участвует в процессе ПГК. В митохондриальном пути передачи сигнала, по которому реализуется большинство форм апоптоза, формированию РТР и выходу цитохрома *c* и эндонуклеаз в межмембранное пространство митохондрий, а затем в цитоплазму, предшествует резкое увеличение АФК. У животных выход цитохрома *c* – ключевое событие, индуцирующее запуск каскада реакций активации каспаз и реализацию ПГК. Регуляция митохондриального пути ПГК включает механизмы, контролируемые уровнем АФК. Показано, что перенос электронов по АП препятствует накоплению АФК и поддерживает митохондриальное дыхание, когда ЦП огра-

ничен ингибиторами или индуцирующими ПГК соединениями [69]. Таким образом, АО регулирует клеточный уровень АФК, который, в свою очередь, определяет восприимчивость к развитию апоптоза, поэтому АО назван “белком выживания” [69].

Роль ионов Ca^{2+} в МРР-зависимой индукции *АОХ1а* менее ясна. Накопление Ca^{2+} в клетке является признаком развивающегося стресса. В животной клетке митохондрии являются “хранилищем” ионов Ca^{2+} и обмениваются ими с ЭР, создавая кальциевые микродомены. В растительной клетке обмен кальция между компартментами осуществляется, скорее всего, консервативными белками-транспортерами, в частности, $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -антипортерами семейства LETM (Leucine zipper, EF hand-containing Transmembrane Protein), имеющими митохондриальную локализацию [11]. Показано, что при солевом стрессе обмен Ca^{2+} между митохондриями и ЭР в растениях *A. thaliana* был связан с индукцией *АОХ1а*. При этом H_2O_2 -стимулируемый синтез ТФ WRKY15 указывал на участие МРР в реакции на этот стресс, и важную роль в этом играет индукция *АОХ1а* [70]. Известно, что ЭР посылает сигналы в ядро в процессе индукции реакции на мисфолдинг белков (UPR, Unfolded Protein Response), представляющего эволюционно консервативный транскрипционный ответ для сохранения гомеостаза ЭР при накоплении неправильно сложенных белков. UPR может участвовать в Ca^{2+} -опосредованной индукции *АОХ1а*, регулируя активность кальциевой помпы ЭР, что свидетельствует о тесной связи между ЭР, ядром и МРР [70].

Антероградная регуляция экспрессии генов АОХ. Трансдукцию сигнала, вызывающего экспрессию АОХ, по антероградному пути могут запускать АФК или другие сигнальные молекулы внутриклеточного происхождения, а также внешние сигналы разной природы [11–13]. Считается, что экспрессия ядерно-кодируемых генов митохондриальных белков в значительной степени представляет собой антероградный контроль функции митохондрий [12]. Усиление экспрессии генов митохондриальных белков обнаружено при прорастании семян и при прохождении других важных фаз развития растения. Это указывает на скоординированный характер экспрессии генов с процессами роста и развития, а также на их вовлеченность в гормональный сигналинг целостного растения [12].

Экспрессия генов АО *A. thaliana* обнаружена, главным образом, в органах с потенциально высокой скоростью метаболизма [42]. Усиленная экспрессия *AtАОХ2* выявлена в семенах, *AtАОХ1b* — в молодых соцветиях; экспрессия *AtАОХ1d* функционально приурочена к процессу старения. Экспрессия всех генов *AtАОХ* зависела также от фазы роста и развития [42]. Промотор гена *AtАОХ1c* со-

держит близко к ССТ элементы сайта II [25], взаимодействующие с ТФ семейства ТСР (Teosinte branched 1 Cycloidea Proliferating cell factor) класса II — негативных факторов клеточного деления [67]. ТСР класса I считаются позитивными регуляторами роста и пролиферации клеток. Однако специфичность последовательности сайта связывания ТСР обоих классов не является абсолютно консервативной, что оставляет возможность конкуренции за сайты связывания между ТСР класса I и II. ТСР участвуют в трансдукции сигналов гормонального происхождения и являются редокс-чувствительными регуляторами ядерно-кодируемых митохондриальных белков компонентов ЭТЦ, играя важную роль в митохондриальном биогенезе [67].

Экспрессия *АОХ* не только находится под гормональным контролем регуляции, но и сигнальные пути активации *АОХ* вовлечены и пересекаются с сигналингом гормонов. Мутанты *A. thaliana* с нарушением полярного транспорта ауксина (*rao3/big*, *rao4/pin-formed 1*, *rao5/multidrug-resistance 1/abcb 19*) проявляли усиление экспрессии *АОХ1а* [67]. Индукция экспрессии репортерного гена люциферазы светлячка, контролируемого промотором *АОХ1а*, подавлялась аналогами ауксина и усиливалась блокированием транспорта гормона. Кроме того, антимицин ингибировал передачу сигналов ауксина и индуцировал экспрессию *АОХ1а*, а обработка ауксином частично снимала этот эффект. Это свидетельствует об антагонистической взаимосвязи между МРР-сигналингом и кинетикой клеточного ответа на ауксин. Показано, что ответ клетки на ауксин может положительно регулироваться митохондриальной функцией через ТСР. Сделано предположение, что передача сигнала митохондриального стресса и трансдукция сигналов ауксина регулируются реципрокно, уравновешивая ростовую и стрессовую реакцию организма [67].

Свет является источником энергии для всех растений. Восприятие светового сигнала клеткой осуществляется через фоторецепторы (фитохромы, фитотропины, криптохромы и др.) [71]. Сигнальные антероградные каскады, приводящие к изменениям экспрессии регулируемых светом генов, начинаются с активирования фоторецептора и его миграции в ядро (у фитохромов). В ядре активированный фоторецептор взаимодействует с Е3-убиквитин-лигазным комплексом COP1/SPA1, высвобождающим ТФ HY5, который инициирует транскрипцию целевых генов. Фитохромы непосредственно могут взаимодействовать с фитохром-инактивирующими факторами, например, PIF3, содержащими домен связывания ДНК, свойственный факторам транскрипции. В трансдукции воспринимаемого фоторецепторами светового сигнала могут участвовать вторичные мессенджеры — Ca^{2+} , сАМР, сGMP, G-белки и другие

компоненты. Считается, что фитохром *A* играет ключевую роль в процессе деэтиоляции и фотоморфогенеза, особенно в условиях слабой освещенности, а фитохром *B* – в реакции растений на повышенную освещенность, хотя оба фитохрома важны в процессе фотоморфогенеза [71].

Проблема световой регуляции экспрессии *АОХ* в настоящее время интенсивно исследуется, в том числе и в наших работах [7, 32, 36, 44, 72]. Считается, что *АО* участвует в окислении избытка НАДФ·Н хлоропластного происхождения, способствуя тем самым “разгрузке” хлЭТЦ [73, 74]. Показано, что в световой регуляции экспрессии *АОХ1а* *A. thaliana* могут участвовать фитохромы *A*, *B*, криптохромы 1, 2 и фототропины 1, 2 [31, 75]. Полагают, что сигнал от фоторецепторов до этапа транскрипции *АОХ* передается по известным механизмам фототрансдукции фоторегулируемых, в первую очередь, фотосинтетических генов [76]. Светозависимый характер индукции *АОХ1а* выявлен в листьях *A. thaliana* [36, 51, 75], *Triticum aestivum* [32], *АОХ2а* – семядолях *Glycine max* [77], *АОХ1с* – листьях *Oryza sativa* [44].

Анализ промотора *AtАОХ1а* длиной 1000 п.н. выше ССТ выявил 27 светозависимых CARE, из них 9 были строго индуцируемыми светом [31]. В промоторе гена *АОХ1а* *A. thaliana* также найден часто встречающийся мотив G-box (CACGTG) [78] и CARE II (ACGTG, –93 п.н. от ССТ), перекрывающийся с G-box [26]. Известно, что G-box – это палиндромный консервативный CARE промоторов большинства фоторегулируемых генов, является сайтом связывания транскрипционных факторов GBFs (G-box-Binding Factors) семейства bZIP [79]. Фотоиндуцируемый транспорт GBFs (в частности, GBF-1) из цитоплазмы в ядро является важным этапом трансдукции сигнала между фоторецепцией и светозависимой экспрессией генов. G-box также найден в промоторе *АОХ1а* *Triticum urartu* (GenBank: KD149474.1, –221 и –340 п.н. от ССТ), диплоидного прародителя гексоаллоплоида *Triticum aestivum* [32]. Анализ имеющихся данных дает основание предполагать наличие механизма, посредством которого *АОХ1а* (по крайней мере, в *A. thaliana* и *Triticum aestivum*) связан с фотосинтетической функцией. Таким образом, изучение промотора *AtАОХ1а* позволило выявить светоиндуцируемые CARE, управляемые пока неизвестными ТФ, а также элемент I1, возможно отвечающий за связь *АОХ* с фотосинтезом. Роль разных CAREs в промоторе *АОХ1а* и распознающих их ТФ в фотозависимой регуляции экспрессии *АОХ1а* остается предметом исследований.

На основе усредненных величин экспрессии генов в процессе зеленения относительно величин экспрессии генов в этиолированном листе пшеницы, нами предложена схема индукции *АОХ*

и генов других дыхательных компонентов энергодиссипирующих систем ЭТЦ в процессе зеленения листа пшеницы [7]. “Внешние” и “внутренние” альтернативные (НАД(Ф)-Н-дегидрогеназы участвуют в транспорте электронов к убихинону в обход комплекса I. К системам, рассеивающим протонный градиент, образуемый в ходе реакций в ЭТЦ, относятся разобщающие белки (UCP), подобные UCP животных. Свет по фитохром-опосредованному пути индуцирует экспрессию *АОХ1а*, затем вовлечение *АО* в дыхание. В период быстрого развития тилакоидной системы это способствовало синтезам *de novo* и предотвращению окислительного стресса [32]. После 6 ч зеленения снижение АП изменяло редокс-состояние ЭТЦ и формировало редокс-сигнал, передающийся от митохондрий к ядру по ретроградному пути, что инициировало экспрессию генов других дыхательных нефосфорилирующих путей и антиоксидантных ферментов, участвующих в поддержании редокс-баланса клетки. После 24 ч сигналы из зрелых хлоропластов [80] поступали в ядро, регулируя экспрессию соответствующих генов [32]. Возможно, это были биогенные сигналы, главным участником которых является GUN1 (Genome UNcoupled1) – локализованный в хлоропластах белок, участвующий в гомеостазе пластидных белков. Предполагается, что GUN1 генерирует и передает неизвестный сигнал, активирующий ТФ ABI4, который далее блокирует экспрессию ядерных фотосинтетических генов [81, 82]. Считается, что GUN1 интегрирует многочисленные пластидные сигналы, связанные с состоянием тетрапиролов, хлЭТЦ и, в целом, редокс-состоянием пластида. Участие GUN1/ABI4-сигнального пути в регуляции экспрессии *АОХ1а* и других “дыхательных” генов в процессе становления фотосинтетического аппарата – абсолютно не изученный вопрос.

При этом не исключена и роль MPP-зависимого пути индукции *АОХ1а* в процессе зеленения, в частности, через изменение содержания органических кислот ЦТК [7]. Нами обнаружено усиление дыхания митохондрий и потенциальной активности АП в присутствии малата в первые 6 ч деэтиоляции, что могло свидетельствовать не только об интенсификации функционирования комплекса I ЭТЦ в этот период, но и увеличении активности малатдегидрогеназы ЦТК [7]. Известно, что ЦТК на свету продолжает функционировать с некоторыми модификациями [83]. Показано, что изменения в содержании органических кислот ЦТК (цитрата, малата, 2-оксоглутарата) влияют на экспрессию генов *АО* [68]. В частности, в сигналинге *AtАОХ1а* при ингибировании ЦТК может быть (как и в АФК-зависимом пути) задействован MPP-участок промотора гена. Сообщалось о роли WRKY в ответе *AtАОХ1а* на МФА, который ингибирует аконитазу ЦТК и приводит

к накоплению цитрата [28]. Отметим также, что участие АФК-зависимого МРР-пути сигналинга *AOX1a* при зеленении листа пшеницы менее очевидно. Известно, что этиолированные клетки защищены от чрезмерного образования АФК функционированием светозависимой НАДФ·Н-протохлорофиллидоксиоредуктазы (LPOR); образуемые тройные комплексы хлорофиллид-LPOR-НАДФ·Н являются мощными гасителями энергии [84]. В нашем исследовании образование АФК в листьях пшеницы даже снижалось на ранних стадиях биогенеза хлоропластов [32].

Полученные нами данные позволили заключить, что альтернативный путь дыхания через АО действует как модулятор митохондриальной функции во время деэтиоляции и предположить роль АО в координации вовлечения других дыхательных нефосфорилирующих путей (НФП) для усиления стресс-ответа и стресс-сигнала. Идея о роли АО в координации вовлечения других дыхательных путей и клеточных защитных систем высказана и другими авторами [1, 60]. Исследования с *AOX1a*-мутантами *A. thaliana* показывают, что дефицит (экспрессии гена или количества белка) АО, в отличие от компонентов других НФП, вызывал модификацию профилей экспрессии многих генов и целого транскриптома [1, 11, 36, 85]. Существуют также данные, которые подтверждают *AOX1a*-зависимую экспрессию генов других НФП [51, 56], но показывают отсутствие зависимости *AOX1a* от этих генов [86]. Растения *A. thaliana* с одновременной сверхэкспрессией *AOX1a* и *NDB2* легко переносили воздействие засухи и высокой освещенности, как и растения со сверхэкспрессией только одного гена – *AOX1a*, в отличие от растений со сверхэкспрессией *NDB2* [87]. Промоторы большого генов НФП *A. thaliana* имеют общие с *AOX1a* стресс-чувствительные CAREs [26, 35, 36]. Однако наличие и количество общих мотивов в промоторах не всегда коррелировало с экспрессией генов, что указывает лишь на потенциальную способность генов взаимодействовать на транскрипционном уровне [35, 36, 51].

Хлоропласт-зависимые сигнальные пути экспрессии АOX. Хлоропласты и митохондрии тесно связаны не только метаболическими реакциями, но и взаимодействиями на уровне ретроградных и антероградных сигналов [1, 13, 30]. Эта взаимосвязь позволяет избежать окислительного стресса в хлоропластах и, в целом, в фотосинтезирующей клетке. Считается, что АО совместно с другими компонентами ЭТЦ участвует в окислении избытка восстановителей, транспортируемых посредством разных челночных механизмов из хлоропластов в митохондрии [73, 74]. АФК, редокс-статус компонентов ЭТЦ (главным образом, пластохинонов (PQ)), редокс-активные молекулы стромы пластид (тиоредоксин, глутатион), а также интермедиаты биосинтеза тетрапирролов выполняют роль сиг-

нальных молекул пластидных ретроградных путей, контролирующей экспрессию целевых ядерных генов, в том числе компонентов митохондриального дыхания [81, 82, 88].

Экспрессия *AOX* тесно связана со статусом хлоропластов. В зеленеющих при повышенном освещении (500 мкмоль/(м² с)) листьях *A. thaliana* с нокаутом *AOX1a* (*aox1a*) и растений дикого экотипа, обработанных салицилгидроксамовой кислотой, ингибитором АOX, уменьшение соотношения НАДФ⁺/НАДФ·Н сопровождалось снижением эффективности импорта пластидного белка [89]. Сверхэкспрессия *AOX1a*, напротив, индуцировала накопление хлорофилла и усиливала импорт пластидного белка. Пул убихинона (UQ) и PQ в *aox1a* мутантах уже при умеренном освещении (350 мкмоль/(м² с)) имел более восстановленный статус [90], а величина максимального квантового выхода фотосистемы II (F_v/F_m) – более низкие значения, чем у растений дикого типа [91]. На мутантах *Nicotiana tabacum* L. с разным уровнем экспрессии *AOX1a* показано, что акклиматизация растений в условиях повышенного освещения и засухи была направлена на избежание переноса пула PQ путем снижения количества белка светособирающего комплекса II LHCB2 и увеличения количества АО [92]. Авторы предположили, что исходящий из хлЭТЦ сигнал регулировал количество обоих белков, способствуя поддержанию энергетического баланса хлоропластов при стрессе. Полученные данные подтверждают, что редокс-сигнал, ведущий к быстрой индукции экспрессии АOX, направлен непосредственно из хлоропластов, а редокс-сенсором является уровень восстановленности пула PQ [1, 88].

Современные данные позволяют полагать, что митохондриальные ретроградные сигнальные пути связаны с сетью трансдукции клеточных сигналов и способны интегрировать информацию из нескольких источников, включая хлоропласт, а АО является активным участником в поддержании клеточного сигналинга и взаимосвязи хлоропластов и митохондрий. Ключевые ТФ регуляции экспрессии *AtAOX1a* (ABI4, ANAC013, ANAC017, WRKY40, WRKY63) являются компонентами пластидного ретроградного сигналинга [12, 34, 82]. Сверхэкспрессия *ANAC017* увеличивала экспрессию АOX, но снижала экспрессию генов, кодирующих белки хлоропластов, включая LHCB [34]. В темноте митохондриальные дисфункции в листьях *Nicotiana tabacum* L., вызванные действием разных ингибиторов, усиливали экспрессию MDS-генов, включая гены *AOX1* [93]. Однако на свету экспрессия генов *AOX1* при действии антимицина снижалась, в отличие от миксотиазола, в присутствии которого экспрессия генов оставалась повышенной. Антимицин, как и миксотиазол, является ингибитором комплекса III ЭТЦ,

но одновременно и ингибитором ферредоксин-хинон-редуктазы, участвующей в переносе электронов от акцепторного участка ФС I к PQ при циклическом транспорте электронов (ЦТЭ) в ФС I хлЭТЦ. Полагают, что ограничение с акцепторной стороны ЦТЭ в ФС I является источником ретроградных сигналов из хлоропластов. При этом миксотиазол увеличивал NPQ, а антимицин — снижал величину этого коэффициента [93]. Таким образом, снижение экспрессии *AOX1* при действии антимицина на свету было результатом взаимодействия сигналов, исходящих из обеих органелл. При этом в растениях со сверхэкспрессией *AOX1a* ингибирование ЦТЭ при действии антимицина не влияло на экспрессию других MDS-генов на свету. Другими словами, редокс-состояние хлоропласта действительно влияет на экспрессию *AOX* и других MDS-генов, но митохондриальная дисфункция, сопровождающаяся нарушением потока электронов к кислороду, является первичным условием индукции экспрессии генов. В целом, интеграция сигналов является одним из средств координации метаболических взаимодействий между органеллами, определяющими энергетический статус клетки. Ключевым сигналом этой интеграции, скорее всего, являются АФК, генерируемые обеими органеллами [1, 13].

Предполагается, что в фотосинтезирующей клетке, особенно в условиях высокой освещенности, перевосстановление пула UQ может быть также результатом увеличения фотодыхательного НАД·Н, и может привести к усилению образования АФК и, соответственно, открытия РТР с последующей индукцией *AOX* [66, 88]. Фотосинтетическая активность вызывает изменение содержания основных углеродных метаболитов (сахаров, аминокислот, интермедиатов ЦТК), восстановительного потенциала пиридиннуклеотидов и тиоловых групп белков. Все это, предположительно, может влиять на экспрессию генов и активность митохондриальных белков, в том числе на АО [88]. Показано, что суточные изменения уровня сахаров (снижение — к концу ночи, увеличение — к середине дня), сопровождающиеся изменениями уровня различных гормонов (ауксина и цитокинина — к концу ночи, АБК — к середине дня), контролируют экспрессию многих генов, включая переносчиков ЭТЦ [76]. Это предполагает гормон-зависимую природу трансдукции сигналов, регулирующих экспрессию генов в течение суток. Возможно, этот механизм функционирует и в световой регуляции экспрессии *AOX*, учитывая, что промотор гена *AtAOX1a* содержит мотивы *ABRE* [26]. Выявлено, что активность цитохромного и альтернативного пути *in vivo* в двойных *cytC* (*cytC1b2a* и *cytC1b2b*) мутантах *A. thaliana* зависела от условий фотопериода, определяющего функционирование и состав интермедиатов ЦТК, аминокислот и других метаболитов [94]. Измене-

ния в метаболоме “сигнализовали” о стрессе, участвуя в запуске реакций по пути изменения первичного метаболизма для адаптации к разному фотопериоду. В частности, в условиях длинного дня *cytC* имели повышенную концентрацию гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) и активность АО. ГАМК может действовать в качестве внутреннего стресс-сигнала в растениях, изменяя активность ионных транспортеров. Помимо медиаторного эффекта, ГАМК непосредственно участвует в метаболизме, превращаясь в янтарную кислоту (сукцинат) с последующим включением в ЦТК. Так называемый ГАМК-шунт обеспечивает альтернативную поставку углерода в ЦТК в виде сукцината в обход сукцинил-КоА-синтетазы и снижает возможность циклической работы ЦТК, а вовлечение АО позволяет поддерживать редокс-статус ЭТЦ при дисфункции основного цитохромного пути. Полагают, что цитохром с как ключевой компонент ЦП играет важную роль в процессах роста и развития растений. Мутанты *cytC* имели низкий уровень гиббереллинов и характеризовались повышенным содержанием белков DELLA — репрессоров гибберелинового сигналинга. Поэтому метаболическая связь ГАМК-шунта и активации АО, скорее всего, также интегрирована в сеть гормонального сигналинга [94].

БЕЛОК АО И ПОСТТРАНСЛЯЦИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЕГО АКТИВНОСТИ

Проявлением экспрессии гена является транскрипция информации с ДНК на мРНК с последующей трансляцией в последовательность белковой молекулы. Альтернативная оксидаза (ЕС. 1.10.3.11) — убихинол: кислород-оксидоредуктаза — белок-гомодимер (масса одного полипептида около 32 кДа). Белок закреплен в одном слое внутренней митохондриальной мембраны с матриксной стороны большой гидрофобной частью, образованной спиралями [95]. АО содержит связанный гидроксо-мостиками двухъядерный центр из двух атомов железа смешанной валентности (Fe(II)/Fe(III)). Каждый из железных центров находится в пределах четырех-спиральной связки мономера, консервативен для всех изоформ АО и является активным сайтом восстановления кислорода до воды. Домены N-концов мономеров АО взаимодействуют ковалентной дисульфидной связью путем образования мостика между остатками цистеина, что и является основным в формировании структуры димера [95].

АО синтезируется на циторибосомах в виде белка-предшественника с соответствующей на N-конце сигнальной последовательностью (пре-сиквенсом) [96]. Импорт белка-предшественника АО в митохондрии происходит через специфические белковые поры-транслокаторы при участии шаперонов. После вхождения белка-предшествен-

ника в митохондрию пресиквенс удаляется ассоциированной с комплексом III митохондриальной пептидазой процессинга [96].

Восстановление дисульфидной связи в сульфгидрильную приводит к активации АО. Активность АО *in vitro* (в изолированных митохондриях) зависит от редокс состояния фермента, наличия субстрата (уровня восстановленности UQ), ключевых метаболитов (α -кетокислот), а также определяется количеством синтезированного белка. Механизмы активации АО *in vitro* изучены достаточно полно [3–5]. Система тиоредоксина (Trx) ответственна за восстановление белка АО, в свою очередь, она зависит от окислительно-восстановительного состояния пула НАД(Ф)·Н. Белок Trx, имеющий дисульфидную связь, использует для своего восстановления электроны и протоны от НАД(Ф)·Н, восстанавливая АО. При этом редокс-состояние пула НАД(Ф)·Н зависит от функционирования НАДФ⁺-зависимой изоцитратдегидрогеназы [5].

Активность восстановленной формы АО остается низкой и повышается в условиях высокой восстановленности UQ и/или в присутствии органических кислот. Основными метаболитами, активирующими восстановленный димер АО, являются α -кетокислоты – пируват и глиоксилат. Полагают, что взаимодействие остатков цистеина с α -кетокислотой приводит к образованию тиополуацетала – полностью активированной формы АО [5].

В зависимости от кодирующих АО генов, существуют и разные изоформы АО. Большинство изоформ имеют два остатка цистеина, но есть исключения. Изоформы АОX1A и АОX1B *A. thaliana* и изоформы АО некоторых видов, например, томата и лотоса, имеют третий остаток цистеина около каталитического центра, содержащего атом железа [5]. Анализ посттрансляционной активации АО выявил специфичность изоформ белка по отношению к метаболитам-активаторам АО. АОX1A более чувствительна к α -кетокислотам, чем АОX1C и АОX1D [97]. Кислоты ЦТК также активируют АО в изоформ-специфической манере. АОX1A стимулируется ОА или 2-оксоглутаратом (2-ОГ), АОX1D – только 2-ОГ, а АОX1C нечувствительна к интермедиатам ЦТК. При этом не все изоформы АО в позиции первого остатка цистеина содержат эту аминокислоту. Изоформы АОX1B томата, лотоса, риса и АОX3 NCS-мутантов кукурузы в этой позиции содержат серин и нечувствительны к α -кетокислотам, но активируются сукцинатом через образование эфирной связи [59, 97]. Изоформы АОX2 менее изучены в отношении их активации метаболитами, однако имеющиеся в литературе данные показывают, что основным активатором АОX2 является пируват [5].

Уровень экспрессии генов АО не всегда соответствует количеству белка АО, а последнее – способности или активности фермента *in vivo* (Дополнительные материалы, таблица 1, [6]). Более того, активность АО *in vivo* часто ниже, чем его способность (или максимальная активность), что связано с ограничением доступности субстрата, аллостерических активаторов (α -кетокислот), другими механизмами посттрансляционной активации фермента [6]. Активность АП *in vivo* (v_{alt}) может быть исследована методом изотопной ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) дискриминации [6]. Способность или максимальная активность АО (V_{alt}) определяется методом специфических ингибиторов, который широко используется в настоящее время [3, 6]. Ингибиторами АО являются гидроксамовые кислоты и *n*-пропилгаллат. Величину V_{alt} получают по степени чувствительности дыхания к ингибитору АО и ингибитору цитохромоксидазы – цианида (CN^-) за вычетом остаточного дыхания (в присутствии обоих ингибиторов). Оптимальные концентрации ингибиторов получают путем титрования образца возрастающими концентрациями ингибиторов до насыщения скорости поглощения O_2 [3]. Иногда для обозначения дыхания по АП используют величину цианид-резистентного дыхания (ЦРД) – дыхания в присутствии только ингибитора ЦП. ЦРД не отражает корректно величину V_{alt} .

В исследованиях часто наблюдают более высокую способность АО по сравнению с активностью АО *in vivo*, а также отсутствие изменения уровня белка АО при действии стресс-факторов, что, по-видимому, связано с поддержанием способности быстрой активации фермента в обход высоко энергетических процессов синтеза белка *de novo* [6, 76]. Это придает дыхательному метаболизму пластичность и адаптивность, позволяет клетке быстро реагировать на изменения внутренней и внешней среды.

Вместе с тем, пока мало сведений, подтверждающих существование механизмов посттрансляционной регуляции АО *in vivo*. С использованием генетически модифицированных по АОX растений показано, что уровень белка АО не является главным фактором регуляции активности фермента *in vivo*, но может влиять на активность АО *in vivo* при стрессе. В частности, в нормальных контролируемых условиях роста листья растений табака с повышенным содержанием белка АО (линия S24) имели более высокую величину ЦРД в отличие от антисенсовой линии AS8 со сниженным содержанием белка АО [98]. При этом все линии, включая дикий тип, не отличались по активности АП *in vivo*. Однако при действии разных видов стресса (засуха, фотоингибирование) листья линии S24, в отличие от дикого типа, проявляли повышенную активность АП *in vivo*. В другой работе, при кратковременном действии высокого уровня освеще-

щенности (800 мкмоль/(м²с)) активность АО *in vivo* усиливалась в листьях линии ХХ-2 с повышенным содержанием белка АО и не изменялась в антисенсовых по *AOX1a* растениях *A. thaliana* (линия AS-12) [99]. Отметим, что неспособность к увеличению дыхания по АП в листьях AS-12 компенсировалась в данных условиях активацией дыхания по ЦП. Это дает основание полагать, что изменение метаболических процессов и/или биохимических механизмов регуляции активности белка АО являются решающими при распределении электронов по АП.

Роль АО в стабилизации пула убихинона обсуждается давно, но явных экспериментальных доказательств тому, что пул убихинона, а именно соотношение восстановленного убихинона к общему пулу убихинона (Q_r/Q_t), является фактором, регулирующим активность АО *in vivo*, пока нет [4]. Существуют лишь сведения, косвенно подтверждающие эту идею. В частности, при кратковременном фотоингибировании листа антисенсовой по *AOX1a* линии *A. thaliana* показывали повышенный уровень Q_r/Q_t при отсутствии вовлечения АО *in vivo* и насыщения ЦП одновременно [99]. Известно также, что уровень восстановленности пула убихинона частично регулируется НАД(Ф)·Н-дегидрогеназой, при этом некоторые гены, кодирующие НАД(Ф)·Н-дегидрогеназы, коэкспрессируются с генами АО [35, 36, 51, 76, 78]. Все эти пока немногочисленные данные позволяют полагать, что уровень восстановленности пула убихинона, зависящий от концентрации НАД·Н в цитозоле и митохондриях, влияет на активность АО *in vivo* [6]. Высказано мнение, что для активации АО *in vivo* достаточны очень малые изменения величины Q_r/Q_t [4]. Существование механизмов посттрансляционной регуляции АО *in vivo* α -кетокислотами и системой Тгх, регулирующей редокс-состояние фермента, пока еще не нашло экспериментальных подтверждений и требует дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Альтернативная оксидаза митохондрий является ключевым ферментом, напрямую участвующим в регуляции энергетического и окислительно-восстановительного баланса митохондрий и целостной клетки. Анализ имеющихся в литературе данных свидетельствует о существовании разных механизмов и сложных комбинаций сигнальных путей, регулирующих экспрессию генов АО. АО может напрямую влиять на сигнализацию стресса, снижая генерацию АФК, и косвенно — через изменение энергетического статуса клетки, инициируя определенные сигнальные каскады. Обращает на себя внимание функционирование в клетке множества механизмов транскрипционного и посттранскрипционного контроля как по-

давления экспрессии генов АО в нормальных условиях, так и быстрой индукции их экспрессии при стрессе (на примере *AtAOX1a*). АО кодируется несколькими генами, что позволяет синтезировать разные формы белка, имеющие различные механизмы посттрансляционной активации. Это повышает защиту выполняемой белком функции в растительной клетке. В настоящее время у растений наиболее хорошо изучена митохондриальная ретроградная регуляция экспрессии АОХ. Не четкие различия между митохондриальными и пластидными ретроградными сигнальными путями подчеркивают тесную взаимосвязь между органеллами, но усложняют исследования роли сигналинга АО в управлении энергетическим метаболизмом фотосинтезирующей клетки. Стало ясно, что сигнальные пути регуляции экспрессии АОХ пересекаются с гормональной системой сигналинга. Появились пока немногочисленные сведения о том, что АО является не только мишенью, но и регулятором стресс-сигнала, координируя экспрессию других генов ЭТЦ, формируя и/или усиливая стресс-сигнал. Все эти вопросы нуждаются в дальнейших исследованиях. Углубление знаний о сигналинге АО предопределяет их практическое использование в экологических, медицинских и сельскохозяйственных целях уже в неотдаленной перспективе.

Автор благодарна проф., д.б.н. Т.К. Головки, к.б.н. И.О. Велегжанинову и анонимным рецензентам за ценные замечания и советы при подготовке статьи к публикации.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-14-50366 Экспансия).

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов. Настоящий обзор не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vanlerberghe G.C., Dahal K., Alber N.A., Chadee A. Photosynthesis, respiration and growth: A carbon and energy balancing act for alternative oxidase // *Mitochondrion*. 2020. V. 52. P. 197.
2. Meeuse B.J.D. Thermogenic respiration in aroids // *Plant Physiol*. 1975. V. 26. P. 117.
3. Shugaev A.G. Alternative cyanide-resistant oxidase in plant mitochondria: structure, regulation of activity, and presumable physiological role // *Russ. J. Plant Physiol*. 1999. V. 46. P. 262.
4. Millenaar F.F., Lambers H. The Alternative oxidase: *In vivo* regulation and function // *Plant Biol*. 2003. V. 5. P. 2.
5. Selinski J., Scheibe R., Day D.A., Whelan J. Alternative oxidase is positive for plant performance // *Trends Plant Sci*. 2018. V. 23. P. 588.

6. *Del-Saz N. F., Ribas-Carbo M., McDonald A. E., Lambers H., Fernie A.R., Florez-Sarasa I.* An *in vivo* perspective of the role(s) of the alternative oxidase pathway // *Trends Plant Sci.* 2018. V. 23. P. 206.
7. *Garmash E.V.* Role of mitochondrial alternative oxidase in the regulation of cellular homeostasis during development of photosynthetic function in greening leaves // *Plant Biol.* 2021. V. 23. P. 221.
8. *Arnholdt-Schmitt B., Costa J.H., de Melo D.F.* AOX – a functional marker for efficient cell reprogramming under stress? // *Trends Plant Sci.* 2006. V. 11. P. 281.
9. *González-Meler M.A., Blanc-Betes E., Flower C.E., Ward J.K.* Plastic and adaptive responses of plant respiration to changes in atmospheric CO₂ concentration // *Physiol. Plant.* 2009. V. 137. P. 473.
10. *Saari S., Garcia G.S., Bremer K., Chioda M.M., Andjelkovic A., Debes P.V., Nikinmaa M., Szibor M., Dufour E., Rustin P., Oliveira M.T., Jacobs H.T.* Alternative respiratory chain enzymes: therapeutic potential and possible pitfalls // *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.* 2018. V. 1865. P. 854.
11. *Van Aken O., Giraud E., Clifton R., Whelan J.* Alternative oxidase: a target and regulator of stress responses // *Physiol. Plant.* 2009. V. 137. P. 354.
12. *Ng S., De Clercq I., Van Aken O., Law S.R., Ivanova A., Willems P., Giraud E., Van Breusegem F., Whelan J.* Anterograde and retrograde regulation of nuclear genes encoding mitochondrial proteins during growth, development, and stress // *Mol. Plant.* 2014. V. 7. P. 1075.
13. *Van Aken O.* Mitochondrial redox systems as central hubs in plant metabolism and signaling // *Plant Physiol.* 2021. V. 186. P. 36.
14. *Polidoros A.N., Mylona P.V., Arnholdt-Schmitt B.* Aox gene structure, transcript variation and expression in plants // *Physiol. Plant.* 2009. V. 137. P. 342.
15. *Costa J.H., Pereira dos Santos C., de Sousa e Lima B., Moreira Netto A. N., da Cruz Saraiva K.D., Arnholdt-Schmitt B.* *In silico* identification of alternative oxidase 2 (AOX2) in monocots: A new evolutionary scenario // *J. Plant Physiol.* 2017. V. 210. P. 58.
16. *Takumi S., Tomioka M., Eto K., Naydenov N., Nakamura C.* Characterization of two non-homoeologous nuclear genes encoding mitochondrial alternative oxidase in common wheat // *Genes Genet. Syst.* 2002. V. 77. P. 81.
17. *Brew-Appiah R.A.T., York Z.B., Krishnan V., Roalson E., Sanguinet K.A.* Genome-wide identification and analysis of the *ALTERNATIVE OXIDASE* gene family in diploid and hexaploid wheat // *PLoS ONE.* 2018. V. 13: e0201439. doi.org/
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201439>
18. *Campos M.D., Cardoso H.G., Linke B., Costa J.H., Fernandes de Melo D., Justo L., Frederico A.M., Arnholdt-Schmitt B.* Differential expression and co-regulation of carrot AOX genes (*Daucus carota*) // *Physiol. Plant.* 2009. V. 137. P. 578.
19. *Macedo E.S., Cardoso H.G., Hernandez A., Peixe A.A., Polidoros A., Ferreira A., Cordeiro A., Arnholdt-Schmitt B.* Physiologic responses and gene diversity indicate olive alternative oxidase as a potential source for markers involved in efficient adventitious root induction // *Physiol. Plant.* 2009. V. 137. P. 532.
20. *Cardoso H.G., Campos M.D., Costa A.R., Campos M.C., Nothnagel T., Arnholdt-Schmitt B.* Carrot alternative oxidase gene *AOX2a* demonstrates allelic and genotypic polymorphisms in intron 3 // *Physiol. Plant.* 2009. V. 137. P. 592.
21. *Ding C., Chen C., Su N., Lyu W., Yang J., Hu Z., Zhang M.* Identification and characterization of a natural SNP variant in *ALTERNATIVE OXIDASE* gene associated with cold stress tolerance in watermelon // *Plant Sci.* 2021. V. 304: 110735
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110735>
22. *Arnholdt-Schmitt B.* Efficient cell reprogramming as a target for functional-marker strategies? Towards new perspectives in applied plant-nutrition research // *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 2005. V. 168. P. 617.
23. *Abe F., Saito K., Miura K., Toriyama K.* A single nucleotide polymorphism in the alternative oxidase gene among rice varieties differing in low temperature tolerance // *FEBS Lett.* 2002. V. 527. P. 181.
24. *Polidoros A.N., Mylona P.V., Pasentsis K., Scandalios J.G., Tsafaris A.S.* The maize alternative oxidase 1a (*Aox1a*) gene is regulated by signals related to oxidative stress // *Redox Report.* 2005. V. 10. P. 71.
25. *Ho L.H.M., Giraud E., Lister R., Thirkettle-Watts D., Low J., Clifton R., Howell K.A., Carrie C., Donald T., Whelan J.* Characterization of the regulatory and expression context of an alternative oxidase gene provides insights into cyanide-insensitive respiration during growth and development // *Plant Physiol.* 2007. V. 143. P. 1519.
26. *Ho L.H.M., Giraud E., Uggalla V., Lister R., Clifton R., Glen A., Thirkettle-Watts D., Aken O.V., Whelan J.* Identification of regulatory pathways controlling gene expression of stress-responsive mitochondrial proteins in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2008. V. 147. P. 1858.
27. *Thirkettle-Watts D., McCabe T.C., Clifton R., Moore C., Finnegan P.M., Day D.A., Whelan J.* Analysis of the alternative oxidase promoters from soybean // *Plant Physiol.* 2003. V. 133. P. 1158.
28. *Dojcinovic D., Krosting J., Harris A.J., Wagner D.J., Rhoads D.M.* Identification of a region of the *Arabidopsis* AtAOX1a promoter necessary for mitochondrial retrograde regulation of expression // *Plant Mol. Biol.* 2005. V. 58. P. 159.
29. *De Clercq I., Vermeirssen V., Van Aken O., Vandepoele K., Murcha M.W., Law S.R., Inzé A., Ng S., Ivanova A., Rombaut D., van de Cotte D., Jaspers P., Van de Peer Y., Kangasjärvi J., Whelan J., Van Breusegem F.* The membrane-bound NAC transcription factor ANAC013 functions in mitochondrial retrograde regulation of the oxidative stress response in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2013. V. 25. P. 3472.
30. *Giraud E., Aken O.V., Ho L.H.M., Whelan J.* The transcription factor ABI4 is a regulator of mitochondrial retrograde expression of alternative oxidase 1a // *Plant Physiol.* 2009. V. 150. P. 1286.
31. *Zhang D.-W., Xu F., Zhang Z.-W., Chen Y.-E., Du J.-B., Jia S.-D., Yuan S., Lin H.-H.* Effects of light on cyanide-resistant respiration and alternative oxidase

- function in *Arabidopsis* seedlings // *Plant Cell Environ.* 2010. V. 33. P. 2121.
32. Garmash E.V., Velegzhaninov I.O., Grabelnykh O.I., Borovik O.A., Silina E.V., Voinikov V.K., Golovko T.K. Expression profiles of genes for mitochondrial respiratory energy-dissipating systems and antioxidant enzymes in wheat leaves during de-etiolation // *J. Plant Physiol.* 2017. V. 215. P. 110.
 33. Van Aken O., Zhang B., Law S., Narsai R., Whelan J. AtWRKY40 and AtWRKY63 modulate the expression of stress-responsive nuclear genes encoding mitochondrial and chloroplast proteins // *Plant Physiol.* 2013. V. 162. P. 254.
 34. Ng S., Ivanova A., Duncan O., Law S.R., Van Aken O., De Clercq I., Wang Y., Carrie C., Xu L., Kmiec B., Walker H., Van Breusegem F., Whelan J., Giraud E. A membrane-bound NAC transcription factor, ANAC017, mediates mitochondrial retrograde signaling in *Arabidopsis* // *The Plant Cell.* 2013. V. 25. P. 3450.
 35. Garmash E.V., Velegzhaninov I.O., Ermolina K.V., Rybak A.V., Malyshev R.V. Altered levels of AOX1a expression result in changes in metabolic pathways in *Arabidopsis thaliana* plants acclimated to low dose rates of ultraviolet B radiation // *Plant Science.* 2020. V. 291: 110332.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110332>
 36. Garmash E.V., Belykh E.S., Velegzhaninov I.O. The gene expression profiles of mitochondrial respiratory components in *Arabidopsis* plants with differing amounts of ALTERNATIVE OXIDASE1a under high intensity light // *Plant Signal. Behav.* 2021. V. 16: 3.
<https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1864962>
 37. Nagel D.H., Doherty C.J., Pruneda-Paz J.L., Schmitz R.J., Ecker J.R., Kay S.A. Genome-wide identification of CCA1 targets uncovers an expanded clock network in *Arabidopsis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112: E4802-10.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1513609112>
 38. Safrany J., Haasz V., Mate Z., Ciolfi A., Feher B., Oravecz A., Stec A., Dallmann G., Morelli G., Ulm R., Nagy F. Identification of a novel cis-regulatory element for UV-B-induced transcription in *Arabidopsis* // *Plant J.* 2008. V. 54. P. 402.
 39. Rhoads D.M., McIntosh L. Salicylic acid regulation of respiration in higher plants: alternative oxidase expression // *The Plant Cell.* 1992. V. 4. P. 1131.
 40. Ng S., Giraud E., Duncan O., Law S.R., Wang Y., Xu L., Narsai R., Carrie C., Walker H., Day D.A., Blanco N.E., Strand A., Whelan J., Ivanova A. Cyclin-dependent kinase E1 (CDKE1) provides a cellular switch in plants between growth and stress responses // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. P. 3449.
 41. Rhoads D.M., McIntosh L. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an alternative oxidase protein of *Sauromatum guttatum* (Schott) // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. P. 2122.
 42. Clifton R., Millar A.H., Whelan J. Alternative oxidases in *Arabidopsis*: a comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses // *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. V. 1757. P. 730.
 43. Costa J.H., Hasenfratz-Sauder M.P., Pham-Thi A.T., Lima M.D.S., Dizengremel P., Jolivet Y., de Melo D.F. Identification in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. of two cDNAs encoding mitochondrial alternative oxidase orthologous to soybean alternative oxidase genes 2a and 2b // *Plant Sci.* 2004. V. 167. P. 233.
 44. Feng H.Q., Li H.Y., Zhou G.M., Liang H.G., Duan J.G., Zhi D.J., Li X., Ma J. Influence of irradiation on cyanide-resistant respiration and AOX1 multi-gene family expression during greening of etiolated rice seedlings // *Photosynthetica.* 2007. V. 45. P. 272.
 45. Garmash E.V., Grabelnykh O.I., Velegzhaninov I.O., Borovik O.A., Dalke I.V., Voinikov V.K., Golovko T.K. Light regulation of AOX pathway during greening of etiolated wheat seedlings // *J. Plant Physiol.* 2015. V. 174. P. 75.
 46. Mizuno N., Sugie A., Kobayashi F., Takumi S. Mitochondrial alternative pathway is associated with development of freezing tolerance in common wheat // *J. Plant Physiol.* 2008. V. 165. P. 462.
 47. Grabelnykh O.I., Borovik O.A., Tauson E.L., Pobezhimova T.P., Katyshev A.I., Pavlovskaya N.S., Koroleva N.A., Lyubushkina I.V., Bashmakov V.Yu., Popov V.N., Borovskii G.B., Voinikov V.K. Mitochondrial energy-dissipating systems (alternative oxidase, uncoupling proteins, and external NADH dehydrogenase) are involved in development of frost-resistance of winter wheat seedlings // *Biochemistry (Moscow).* 2014. V. 79. P. 506.
 48. Smith C.A., Melino V.J., Sweetman C., Soole K.L. Manipulation of alternative oxidase can influence salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* // *Physiol. Plant.* 2009. V. 137. P. 459.
 49. Wang J., Vanlerberghe G.C. A lack of mitochondrial alternative oxidase compromises capacity to recover from severe drought stress // *Physiol. Plant.* 2013. V. 149. P. 461.
 50. Gupta K.J., Shah J.K., Brotman Y., Jahnke K., Willmitzer L., Kaiser W.M., Bauwe H., Igamberdiev A.U. Inhibition of aconitase by nitric oxide leads to induction of the alternative oxidase and to a shift of metabolism towards biosynthesis of amino acids // *J. Exp. Bot.* 2012. V. 63. P. 1773.
 51. Yoshida K., Noguchi K. Differential gene expression profiles of the mitochondrial respiratory components in illuminated *Arabidopsis* leaves // *Plant Cell Physiol.* 2009. V. 50. P. 1449.
 52. Zhu L.-J., Deng X.-G., Zou L.-J., Zhang D.-W., Lin H.-H. Enhancement of stress tolerance in cucumber seedlings by proanthocyanidins // *Biol. Plant.* 2017. V. 61. P. 323.
 53. Panda S.K., Sahoo L., Katsuhara M., Matsumoto H. Overexpression of alternative oxidase gene confers aluminum tolerance by altering the respiratory capacity and the response to oxidative stress in tobacco cells // *Mol. Biotechnol.* 2012. V. 54. P. 551.
 54. Keunen E., Jozefczak M., Remans T., Vangronsveld J., Cuypers A. Alternative respiration as a primary defense during cadmium-induced mitochondrial oxidative challenge in *Arabidopsis thaliana* // *Environ. Exp. Bot.* 2013. V. 91. P. 63.

55. Pasqualini S., Paolucci F., Borgogni A., Morettini R., Ederli L. The overexpression of an alternative oxidase gene triggers ozone sensitivity in tobacco plants // *Plant Cell Environ.* 2007. V. 30. P. 1545.
56. Watanabe C.K., Hachiya T., Takahara K., Kawai-Yamada M., Uchimiya H., Uesono Y., Terashima I., Noguchi K. Effects of *AOX1a* deficiency on plant growth, gene expression of respiratory components and metabolic profile under low-nitrogen stress in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell Physiol.* 2010. V. 51. P. 810.
57. Cvetkovska M., Vanlerberghe G.C. Alternative oxidase impacts the plant response to biotic stress by influencing the mitochondrial generation of reactive oxygen species // *Plant Cell Environ.* 2013. V. 36. P. 721.
58. Matos A.R., Mendesa A.T., Scotti-Campos P., Arrabaca J.D. Study of the effects of salicylic acid on soybean mitochondrial lipids and respiratory properties using the alternative oxidase as a stress-reporter protein // *Physiol. Plant.* 2009. V. 137. P. 485.
59. Karpova O.V., Kuzmin E.V., Elthon T.E., Newton K.J. Differential expression of alternative oxidase genes in maize mitochondrial mutants // *The Plant Cell.* 2002. V. 14. P. 3271.
60. Juszczuk I.M., Szal B., Rychter A.M. Oxidation-reduction and reactive oxygen species homeostasis in mutant plants with respiratory chain complex I dysfunction // *Plant Cell Environ.* 2012. V. 35. P. 296.
61. Yurina N.P., Odintsova M.S. Signal transduction pathways of plant mitochondria: Retrograde regulation // *Russ. J. Plant Physiol.* 2010. V. 57. P. 7.
62. Li C.R., Liang D.D., Xu R.F., Li H., Zhang Y.P., Qin R.Y., Li L., Wei P.C., Yang J.B. Overexpression of an alternative oxidase gene, *OsAOX1a*, improves cold tolerance in *Oryza sativa* L. // *Genet. Mol. Res.* 2013. V. 12. P. 5424.
63. Liu J., Li Z., Wang Y., Xing D. Overexpression of *ALTERNATIVE OXIDASE1a* alleviates mitochondria-dependent programmed cell death induced by aluminium phytotoxicity in *Arabidopsis* // *J. Exp. Bot.* 2014. V. 65. P. 4465.
64. Wagner A.M. A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in *Petunia hybrida* cells // *FEBS Lett.* 1995. V. 368. P. 339.
65. Maxwell D.P., Nickels R., McIntosh L. Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with pathogen attack and senescence // *Plant Journal.* 2002. V. 29. P. 269.
66. Amirsadeghi S., Robson C.A., Vanlerberghe G.C. The role of the mitochondrion in plant responses to biotic stress // *Physiol. Plant.* 2007. V. 129. P. 253.
67. Ivanova A., Law S.R., Narsai R., Duncan O., Lee J.H., Zhang B., Van Aken O., Radomiljac J.D., van der Merwe M., Yi K., Whelan J. A. Functional antagonistic relationship between auxin and mitochondrial retrograde signaling regulates *Alternative Oxidase 1a* expression in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2014. V. 165. P. 1233.
68. Gray G.R., Maxwell D.P., Villarimo A.R., McIntosh L. Mitochondria/nuclear signaling of alternative oxidase gene expression occurs through distinct pathways involving organic acids and reactive oxygen species // *Plant Cell Rep.* 2004. V. 23. P. 497.
69. Robson C.A., Vanlerberghe G.C. Transgenic plant cells lacking mitochondrial alternative oxidase have increased susceptibility to mitochondria-dependent and -independent pathways of programmed cell death // *Plant Physiol.* 2002. V. 129. P. 1908.
70. Vanderauwera S., Vandenbroucke K., Inze A., van de Cotte B., Muhlenbock P., De Rycke R., Naouar N., Van Gaever T., Van Montagu M.C., Van Breusegem F. AtWRKY15 perturbation abolishes the mitochondrial stress response that steers osmotic stress tolerance in *Arabidopsis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2012. V. 109. P. 20113.
71. Kreslavski V.D., Carpentier R., Klimov V.V., Allakhverdiev S.I. Transduction mechanisms of photoreceptor signals in plant cells. // *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem Rev.* 2009. V. 10. P. 63.
72. Ribas-Carbó M., Aroca R., González-Meler M.A., Iriyoyen J.J., Sanchez-Diaz M. The electron partitioning between the cytochrome and alternative respiratory pathways during chilling recovery in two cultivars of maize differing in chilling sensitivity // *Plant Physiol.* 2000. V. 122. P. 199.
73. Noguchi K., Yoshida K. Interaction between photosynthesis and respiration in illuminated leaves // *Mitochondrion.* 2008. V. 8. P. 887.
74. Dinakar C., Raghavendra A.S., Padmasree K. Importance of AOX pathway in optimizing photosynthesis under high light stress: Role of pyruvate and malate in activating of AOX // *Physiol. Plant.* 2010. V. 139. P. 13.
75. Tepperman J.M., Hudson M.E., Khanna R., Zhu T., Chang S.H., Wang X., Quail P.H. Expression profiling of *phyB* mutant demonstrates substantial contribution of other phytochromes to red-light-regulated gene expression during seedling de-etiolation // *Plant Journal.* 2004. V. 38. P. 725.
76. Rasmusson A.G., Escobar M. Light and diurnal regulation of plant respiratory gene expression // *Physiol. Plant.* 2007. V. 129. P. 57.
77. Finnegan P.M., Whelan J., Millar A.H., Zhang Q., Smith M.K., Wiskich J.T., Day D.A. Differential expression of the multigene family encoding the soybean mitochondrial alternative oxidase // *Plant Physiol.* 1997. V. 114. P. 455.
78. Clifton R., Lister R., Parker K.L., Sappl P.G., Elhafez D., Millar A.H., Day D.A., Whelan J. Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Mol. Biol.* 2005. V. 58. P. 193.
79. Menkens A.E., Schindler U., Cashmore A.R. The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins // *Trends Biochem. Sci.* 1995. V. 20. P. 506.
80. Garmash E.V., Dymova O.V., Malyshev R.V., Plyusnina S.N., Golovko T.K. Developmental changes in energy dissipation in etiolated wheat seedlings during the greening process // *Photosynthetica.* 2013. V. 51. P. 497.
81. Kusnetsov V.V. Chloroplasts: Structure and expression of the plastid genome // *Russ. J. Plant Physiol.* 2018. V. 65. P. 465.

82. Yurina N.P., Odintsova M.S. Chloroplast Retrograde Signaling System // Russ. J. Plant Physiol. 2019. V. 66. P. 509.
83. Tcherkez G., Boex-Fontvieille E., Mahe A., Hodges M. Respiratory carbon fluxes in leaves // Curr. Opin. Plant Biol. 2012. V. 15. P. 308.
84. Schoefs B., Franck F. Protochlorophyllide reduction: mechanisms and evolution // Photochem. Photobiol. 2003. V. 78. P. 543.
85. Wallström S.V., Florez-Sarasa I., Wagner L., Araújo W.L., Escobar M.A., Geisler D.A., Aidemark M., Lager I., Fernie A.R., Ribas-Carbo M., Rasmusson A.G. Suppression of NDA-type alternative mitochondrial NAD(P)H dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana* modifies growth and metabolism, but not high light stimulation of mitochondrial electron transport // Plant Cell Physiol. 2014. V. 55. P. 881.
86. Sweetman C., Waterman C.D., Rainbird B.M., Smith P.M.C., Jenkins C.D., Day D.A., Soole K.L. AtNDB2 is the main external NADH dehydrogenase in mitochondria and is important for tolerance to environmental Stress // Plant Physiol. 2019. V. 181. P. 774.
87. Giraud E., Ho L.H.M., Clifton R., Carroll A., Estavillo G., Tan Y.F., Howell K.A., Ivanova A., Pogson B.J., Millar A.H., Whelan J. The absence of *ALTERNATIVE OXIDASE1a* in *Arabidopsis* results in acute sensitivity to combined light and drought stress // Plant Physiol. 2008. V. 147. P. 595.
88. Van Lis R., Atteia A. Control of mitochondrial function via photosynthetic redox signals // Photosynth. Res. 2004. V. 79. P. 133.
89. Zhang D.-W., Yuan S., Xu F., Zhu F., Yuan M., Ye H.-X., Guo H.-Q., Lv X., Yin Y., Lin H.-H. Light intensity affects chlorophyll synthesis during greening process by metabolite signal from mitochondrial alternative oxidase in *Arabidopsis* // Plant Cell Environ. 2016. V. 39. P. 12.
90. Yoshida K., Watanabe C.K., Hachiya T., Tholen D., Shibata M., Terashima I., Noguchi K. Distinct responses of the mitochondrial respiratory chain to long- and short-term high-light environments in *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell Environ. 2011. V. 34. P. 618.
91. Watanabe C.K.A., Yamori W., Takahashi S., Terashima I., Noguchi K. Mitochondrial alternative pathway-associated photoprotection of photosystem II is related to the photorespiratory pathway // Plant Cell Physiol. 2016. V. 57. P. 1426.
92. Dahal K., Martyn G.D., Vanlerberghe G.C. Improved photosynthetic performance during severe drought in *Nicotiana tabacum* overexpressing a nonenergy conserving respiratory electron sink // New Phytol. 2015. V. 208. P. 382.
93. Alber N.A., Vanlerberghe G.C. Signaling interactions between mitochondria and chloroplasts in *Nicotiana tabacum* leaf // Physiol. Plant. 2019. V. 167. P. 188.
94. Florez-Sarasa I., Welchen E., Racca S., Gonzalez D.H., Vallarino J.G., Fernie A.R., Ribas-Carbo M., Del-Saz N.F. Cytochrome *c* deficiency differentially affects the *in vivo* mitochondrial electron partitioning and primary metabolism depending on the photoperiod // Plants. 2021. V. 10: 444. <https://doi.org/10.3390/plants10030444>
95. Albury M.S., Elliott C., Moore A.L. Towards a structural elucidation of the alternative oxidase in plants // Physiol. Plant. 2009. V. 137. P. 316.
96. Tanudji M., Sjöling S., Glaser E., Whelan J. Signals required for the import and processing of the alternative oxidase into mitochondria // J. Biol. Chem. 1999. V. 274 P. 1286.
97. Selinski J., Hartmann A., Kordes A., Deckers-Hebestreit G., Whelan J., Scheibe R. Analysis of posttranslational activation of alternative oxidase isoforms // Plant Physiol. 2017. V. 174. P. 2113.
98. Guy R.D., Vanlerberghe G.C. Partitioning of respiratory electrons in the dark in leaves of transgenic tobacco with modified levels of alternative oxidase // Physiol. Plant. 2005. V. 125. P. 171.
99. Florez-Sarasa I., Flexas J., Rasmusson A.G., Umbach A.L., Siedow J.N., Ribas-Carbo M. *In vivo* cytochrome and alternative pathway respiration in leaves of *Arabidopsis thaliana* plants with altered alternative oxidase under different light conditions // Plant Cell Environ. 2011. V. 34. P. 1373.
100. Priault P., Vidal G., De Paepe R., Ribas-Carbo M. Leaf age-related changes in respiratory pathways are dependent on complex I activity in *Nicotiana sylvestris* // Physiol. Plant. 2007. V. 129.

УДК 581.1

РАЗНООБРАЗИЕ ТИПОВ ДИАЦИЛГЛИЦЕРИН АЦИЛТРАНСФЕРАЗ РАСТЕНИЙ И ОСОБЕННОСТИ ИХ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ, ИЛИ СКОЛЬКО DGAT НУЖНО РАСТЕНИЯМ

© 2022 г. О. С. Павленко^а, *, Ю. В. Акашкина^а, А. В. Сухорукова^а, Р. А. Сидоров^а, В. Д. Цыдендамбаев^а

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

*e-mail: Helliga.p@gmail.com

Поступила в редакцию 05.04.2021 г.

После доработки 07.05.2021 г.

Принята к публикации 07.05.2021 г.

Появление *sn*-1,2-диацил-3-ацилтрансфераз (DGAT, ДАГАТ) – ключевых ферментов биосинтеза триацилглицеринов (ТАГ) – можно рассматривать как важный ароморфоз в эволюции и органического мира в целом, и растений в частности, так как возникновение способности запасать углерод, энергию, воду и “строительные блоки” в виде гидрофобных соединений позволило повысить “емкость” запасных веществ в клетках и одновременно уменьшить объем органов запаса. DGAT есть практически у всех живых организмов от слизевиков, мхов, грибов, водорослей до млекопитающих и человека. Несмотря на такую распространенность в мире живой материи, проследить закономерности в организации, эволюции и функционировании этих ферментов очень непросто – у организма может быть несколько DGAT, принадлежащих к разным типам, имеющих разную локализацию в клетке, способных использовать разные субстраты или конкурировать за один. Их роднит только выполняемая функция – перенос от ацил-КоА остатка жирной кислоты (ЖК) на *sn*-1,2-диацил-глицерин (а в некоторых случаях DGAT могут ацилировать стеринны, высшие жирные спирты и другие субстраты), чтобы сформировать молекулу ТАГ. Активные исследования этих ферментов, продолжающиеся последние 50 лет, пока задают больше вопросов, чем ответов; вместе с тем, ясное понимание особенностей организации и функционирования DGAT открывает вероятные возможности в области биотехнологии и генной инженерии функциональных липидов для пищевой, фармацевтической и сельскохозяйственной индустрии и т. д. В нашем обзоре мы предприняли попытку суммировать результаты исследований последних лет о структурных и функциональных особенностях DGAT, влиянии эндогенных и экзогенных факторов на уровень экспрессии их генов, и адаптивной роли генов этих белков в эволюции живых организмов.

Ключевые слова: диацилглицерин ацилтрансфераза, DGAT, триацилглицерин, метаболизм липидов
DOI: 10.31857/S001533032201016X

ВВЕДЕНИЕ

За последние 20 лет мировое потребление растительных масел резко возросло и составляет около 200 млн тонн в год, вероятно, эта динамика сохранится и в ближайшие десятилетия [1]. Причина такого роста состоит в том, что растительные масла служат важнейшим продуктом питания людей (на их долю приходится до 25% калорийности дневного рациона), а содержащиеся во многих из них значительные количества таких жирных кислот (ЖК), как линолевая и α -линоленовая, представляют собой незаменимые компоненты питания млекопитающих. Кроме того, растительные масла широко используются в качестве сырья для получения смазок, олифы, технических масел и др., а также в качестве корма для животных.

Начиная с 2000-х годов, стремительно растет производство СО-нейтрального биотоплива, в том числе из растительных масел – этиловых и метиловых эфиров жирных кислот (биодизель). Так, только в США производство биодизеля в период с 2010 по 2019 годы выросло более чем в 8 раз и составляет на данный момент 9.8 млн м³ в год [2]. Несмотря на то, что доля биодизеля, вырабатываемого из растительных масел, не превышает 20% (остальное приходится на биоэтанол, производимый из пшеницы, картофеля, сахарной свеклы и кукурузы), его производство растет синхронно с общим спросом на возобновляемые источники энергии [3, 4]. Не меньшее значение сегодня имеют масла с необычным составом ЖК, которые используются в качестве промышлен-

ных лубрикантов и в медицинских целях. Все это обуславливает интенсивные исследования в области биосинтеза ЖК и масел (запасных липидов) в растениях, поиска источников новых необычных масел, изучения ферментов, ответственных за их биосинтез и генов, их кодирующих, на протяжении последних нескольких десятилетий.

Основной практически всех растительных масел являются триацилглицерины (ТАГ) – сложные эфиры глицерина и ЖК. Причина такой распространенности ТАГ среди растений состоит в том, что они, обладая относительно небольшой молекулярной массой, позволяют запастись большим количеством углерода, энергии и ацилов ЖК [5]. От того, какие ЖК (или радикалы) этерифицируют *sn*-положения глицеринового остатка в молекуле ТАГ, непосредственно зависят не только их физические свойства, такие как температура плавления или точка кристаллизации [6], но инутрицевтические, такие как окислительная стабильность [7], скорость абсорбции в желудочно-кишечном тракте теплокровных [8], способность влиять на атерогенез [8]. Так, жирные кислоты в *sn*-1 и *sn*-3 положениях легче гидролизуются липазой, в то время как ЖК в *sn*-2-положении гораздо лучше абсорбируются в форме *sn*-2-моноацилглицеринов. Например, дети лучше усваивают пальмитиновую кислоту из *sn*-2-положения ТАГ, которыми богато материнское молоко, чем аналогичную кислоту из растительных масел, где она этерифицирует исключительно *sn*-1 и *sn*-3 положения [9]. ТАГ, содержащие полиненасыщенные ЖК (ПНЖК; в особенности, арахидоновую и эйкозапентаеновую) преимущественно в *sn*-2-положении, гораздо лучше абсорбируются, чем молекулярные виды ТАГ, у которых ПНЖК случайно распределены между всеми тремя *sn*-положениями глицеринового остатка [7]. В свете этих сведений для исследователей представляет интерес поиск или создание источников так называемых “структурированных ТАГ” (сТАГ), которые содержали бы в *sn*-1 и *sn*-3 положениях ЖК с короткой цепью (например, миристиновую или лауриновую), а в *sn*-2-положении – ПНЖК. сТАГ подобного строения могут защитить организм от гипертриглицеридемии и ожирения, вызванных диетами с высоким содержанием жиров [10]. Помимо того, сТАГ могут применяться для ускорения снижения веса, замедления накопления жира липоцитами, а также для снижения уровня холестерина в крови [11, 12].

Если в составе ТАГ во всех трех положениях находится одна и та же ЖК, то такая молекула является симметричной и не проявляет оптических свойств, если ТАГ содержит две или три разных ЖК, то такая молекула становится асимметричной и начинает обнаруживать оптическую активность. Наиболее высокая оптическая активность характерна для ТАГ, содержащих необычные ЖК [13]. ТАГ из семян *Monnina emarginata*, содержа-

щих кориолиновую (13-окси-цис-9-транс-11-октадекадиеновую) кислоту, обнаруживают высокую оптическую активность, которая обусловлена ацилами необычных ЖК в *sn*-3-положении [14]. Как отмечалось выше, симметричные и асимметричные ТАГ обладают разными свойствами. Например, с середины 90-х годов прошлого века активно изучаются необычные асимметричные *sn*-1,2-диацил-3-ацетил-глицерины (*Ac*ДАГ), *sn*-3-положение которых этерифицировано уксусной кислотой. По сравнению с ТАГ обычного состава, они обладают пониженной на 30% вязкостью и почти вдвое меньшей калорийностью (5 против 9 ккал/г у ТАГ), эти свойства позволяют рассматривать *Ac*ДАГ в качестве пищевой добавки для диетического питания людей [15]. В качестве “функциональной еды” *Ac*ДАГ интересны по той причине, что подобные им соединения, известные под торговой маркой SALATRIM®, в клинических испытаниях достоверно снижали чувство голода и повышали ощущение сытости, по сравнению с продуктами, содержащими ТАГ обычного состава [16]. Относительно недавно стало известно еще одно свойство *Ac*ДАГ. В 2004 году Yang с соавторами показали, что *Ac*ДАГ, выделенные из пантов пятнистого оленя (*Cervus nippon* Temminck), способны стимулировать гемопоэз [17], позднее было показано, что *sn*-1-пальмитоил-2-линолеоил-3-ацетилглицерин (PLAG) – главный молекулярный вид фракции *Ac*ДАГ в пантах пятнистого оленя – оказывает влияние на хемотаксис эозинофилов, вследствие чего облегчает течение астмы у пациентов [18]. Позднее было показано, что PLAG способен облегчать гемопоэтические повреждения при гамма-индуцированной острой лучевой болезни и уменьшать смертность от облучения даже при отсроченном введении [19]. PLAG также ослабляет вызванную химиотерапией нейтропению у онкологических больных посредством ингибирования синтеза хемокинов [20]. В свете этих данных, *Ac*ДАГ природного происхождения представляют не только технологический инутрицевтический, но и терапевтический интерес.

ТАГ некоторых растений имеют уникальный состав. Так, необычные ω-фенилалкановые и ω-фенилалкеновые кислоты содержатся в составе ТАГ семян растений рода *Dracunculus* (Белокрыльник, или Калла) [21]. У растения *Lilium longiflorum* (лилия длинноцветковая) встречаются необычные аналоги ДАГ, у которых вместо остатков ЖК в *sn*-1-или в *sn*-3-положениях находятся остатки уксусной кислоты, а в *sn*-2-положении содержится глюкоза [22].

Несмотря на большое многообразие “типов” (молекулярных видов) ТАГ, практически у всех организмов прослеживаются сходные пути их биосинтеза [23]: последовательное ацилирование *sn*-глицеро-3-фосфата различными ацилтрансферазами – этот механизм более известен как

“путь Кеннеди”. Ключевой и последней реакцией биосинтеза ТАГ в нем является ацилирование *sn*-1,2-диацилглицерина (ДАГ) ацилом жирной кислоты, которую осуществляет фермент *sn*-1,2-диацил-3-ацилтрансфераза (ДАГАТ, DGAT, EC 2.3.1.20, далее DGAT). Этот фермент используется в качестве субстратов ДАГ и ацил-КоА, в результате чего образуется молекула ТАГ. Активность этого фермента, его субстратная специфичность являются решающими факторами в образовании различных молекулярных видов ТАГ, а потому, резонно предположить, что, управляя DGAT, можно получать масла с заданными физическими илинутрицевтическими свойствами, повышать масличность важнейших культур, создавать новые продуценты различных видов ТАГ. Несмотря на значимость вопросов, решение которых невозможно без точного понимания механизмов работы DGAT, их структуры, способов регуляции активности данных ферментов, DGAT растений до сих пор недостаточно изучены. В представленном обзоре мы обобщили актуальную информацию о DGAT растений, уделив пристальное внимание структурным особенностям DGAT разных типов.

ПУТИ БИОСИНТЕЗА ТАГ И РОЛЬ DGAT В ЭТОМ ПРОЦЕССЕ

Прежде чем рассматривать структуру и функции DGAT у растений, мы считаем целесообразным кратко описать основные пути биосинтеза ТАГ с акцентом на том, какую роль в этом процессе играют различные типы DGAT и как их активность влияет на накопление ТАГ у растений. В зависимости от того, какой субстрат является донором ЖК для реакций ацилирования глицеринового остатка, выделяют ацил-СоА-зависимый и ацил-СоА-независимый пути биосинтеза ТАГ [24].

Ацил-СоА-независимый путь формирования ТАГ представляет собой перенос остатка ЖК на ДАГ от фосфолипида, в этом процессе важную роль играет фермент фосфолипид : диацилглицерин ацилтрансфераза (ФЛДАТ, PDAT, EC 2.3.1.158) [25]. В ацил-СоА-зависимом пути синтеза ТАГ, также известном как “путь Кеннеди”, донорами ацильных остатков для синтеза ТАГ являются молекулы ацил-СоА [26]. Биосинтез ТАГ из глицерол-3-фосфата и остатков ЖК осуществляется в ходе трех последовательных реакций ацилирования, с помощью ферментов *sn*-глицерол-3-фосфат-ацилтрансферазы (ГЗФ-АТ, GPAT, 2.3.1.15), ацилтрансферазы лизофосфатидной кислоты (АТЛФК, LPAAT, 2.3.1.51) и *sn*-1,2-диацил-3-ацилтрансферазы (DGAT) [24]. Все реакции пути Кеннеди протекают на мембранах эндоплазматического ретикулума (ЭР) или липосом. Существует и так называемый, альтернативный путь синтеза ТАГ, происходящий в цитозоле: *sn*-2-моноацилглице-

рин (МАГ) образуется из лизофосфатидной кислоты ферментом LPA-фосфатазой (3.1.3.106), далее с помощью моноацилглицерин ацилтрансферазы (МАГАТ, MGAT, 2.3.1.22) МАГ превращается в ДАГ, а растворимая DGAT осуществляет ацилирование ДАГ до ТАГ (рис. 1) [27].

Долгое время считалось, что все ацилтрансферазы обладают высокой специфичностью как к ацил-содержащему субстрату, так и к молекуле, на которую они переносят ацильную группу [28]. Недавние исследования показывают, что существуют формы DGAT, способные использовать в качестве субстрата вещества различной химической природы: липофильные диацилглицерины и гидрофильные ацил-СоА, например, ацетил-СоА [15]. Помимо этого известно, что на субстратную специфичность DGAT влияют такие факторы, как ЖК- и позиционно-видовой состав пула ДАГ конкретного организма, концентрация и ЖК-состав ацил-СоА, а также температура окружающей среды [24].

Уровень активности ферментов семейства DGAT можно считать одним из лимитирующих факторов при накоплении запасных липидов. Так, на примере *Arabidopsis thaliana* (резуховидка Таля) и *Glycine max* (соя культурная) было показано, что в отсутствие активности DGAT достоверно снижался уровень ТАГ в семенах [29, 30]. И наоборот, высокоэффективная экспрессия генов, кодирующих DGAT, у *A. thaliana* приводила к повышению накопления масла в семенах, а подавление экспрессии этих генов – к снижению масличности семян [29]. Следует отметить, что активность DGAT, возможно, важна и для корректного распределения ацилов необычных ЖК в запасных липидах семян [27]. Следовательно, ферменты семейства DGAT могут определять и качественный состав ТАГ, и уровень их накопления. Исходя из вышесказанного, DGAT можно назвать ключевыми регуляторными ферментами липидного гомеостаза эукариот, объединяющими потоки углерода и энергии за счет биосинтеза ТАГ. Функциональные особенности DGAT интенсивно изучаются на протяжении нескольких десятилетий, однако до сих пор остается открытым ряд вопросов, касающихся свойств данного фермента.

КЛАССИФИКАЦИЯ DGAT

Существует несколько подходов к классификации этих ферментов: по времени их открытия, по субстратной специфичности и по локализации в клетке. Так, первым трем типам в зависимости от времени их обнаружения были присвоены числовые индексы (DGAT1, DGAT2, DGAT3). Названия еще двух типов DGAT отражают их функциональные особенности (WS/DGAT, DAcT). К первому типу ферментов семейства DGAT относятся белки (DGAT1), впервые обнаруженные в

печени кур (*Gallus gallus domesticus*) [31]. DGAT1 является гомологом ацилтрансферазы ацил-СоА/холестеринэстеразы (АСАТ, ЕС 2.3.1.26) млекопитающих и имеет с ней структурное сходство, а расхождение в их аминокислотных последовательностях определяет субстратную специфичность DGAT1 к ДАГ. Оба фермента принадлежат к большому семейству мембраносвязанных О-ацилтрансфераз (МВОАТ) [32]. Все представители МВОАТ характеризуются наличием консервативных остатков гистидина в С-концевой области фермента и переносят ЖК на гидроксильные группы мишеней, внедренных в мембрану. Так АСАТ осуществляют перенос ЖК на холестерин, DGAT1 – на ДАГ, Are1/2 – на стероиды, WS (wax-synthase) – на высшие жирные спирты [32]. Локализуется DGAT1 главным образом в ЭР, но также может присутствовать в мембранах пластид и олеосом. В настоящее время гомологи гена *DGAT1* найдены у растений рода *Arabidopsis* [33], *Olea europaea* (олива европейская) [34], *Brassica napus* (рапс обыкновенный) [35], *Ricinus communis* (клешевина обыкновенная) [36], *Vernicia fordii* (тунг Форда) [37], *Tropaeolum majus* (настурция большая) [38], *Helianthus annuus* (подсолнечник однолетний) [39], *Macadamia tetraphylla* (макадамия четырехлистая) [40] и др.

Ко второму типу относят ферменты, называемые DGAT2, которые имеют сходство с ацил-СоА: моноацилглицерин ацилтрансферазами (MGAT, ЕС 2.3.1.22) и с ацил-СоА ацилтрансферазами восковых спиртов (Awat, ЕС 2.3.1.75). Ферменты этого типа были обнаружены у грибов, круглых червей, человека и у некоторых видов растений, таких как *A. thaliana* [41], *V. fordii* [37] и *O. europaea* [42]. DGAT2 является мембраносвязанным ферментом и локализуется в ЭР и на поверхности олеосом.

К третьему типу относятся DGAT3, участвующие в альтернативном пути синтеза ТАГ, происходящем в цитозоле. На данный момент это единственный известный растворимый фермент семейства DGAT. Первоначально этот фермент был выделен из семян *Arachis hypogaea* (арахис культурный) [27], а недавно был обнаружен также у видов рода *Arabidopsis* [43], в дрожжах *Rhodotorula glutinis* [44] и у некоторых водорослей [45].

Четвертый тип ферментов представлен бифункциональными белками WS/DGAT, проявляющими, преимущественно, свойства синтетаз восковых эфиров, а также ацетил-СоА диацилглицерин ацилтрансфераз. Впервые этот фермент был обнаружен у *Acinetobacter calcoaceticus* [46]. Гомологи WS/DGAT также охарактеризованы у *Petunia hybrida* (петуния гибридная) [47] и *Arabidopsis* [48], на этих же растениях было показано, что данный фермент локализуется на мембранах ЭР.

Помимо этого, недавно у *Euonymus alatus* (бересклет крылатый) была обнаружена особая форма DGAT (*EaDacT*), ответственная за синтез ацетилированных диацилглицеринов (*Ac*ДАГ). Как и DGAT1, эта форма принадлежит к семейству мембраносвязанных О-ацилтрансфераз (МВОАТ), но, в отличие от других представителей данного семейства, *EaDacT* катализирует передачу коротких ацильных групп (С2–С6), причем эффективность использования ацил-КоА в качестве доноров ацила увеличивается с уменьшением углеродной цепи жирнокислотного остатка [49].

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ DGAT РАЗНЫХ ТИПОВ

За исключением DGAT3, все ферменты семейства DGAT являются мембраносвязанными белками, что значительно осложняет исследование их трехмерной структуры существующими физическими методами. Наиболее демонстративной моделью, полученной с помощью рентгеноструктурного анализа, является модель WS/DGAT из *Marinobacter aquaeolei* [50]. Пространственная структура ни одного из DGAT, принадлежащих высшим организмам, в настоящее время не определена. Большинство сведений о структурных особенностях этих ферментов получено с использованием методов *in silico*. В 2011 году группой ученых из университета Нового Орлеана методами биоинформатики был проведен структурно-функциональный анализ аминокислотных последовательностей DGAT1 и DGAT2 из семидесяти организмов [51], в 2017 году Vagnatoc с соавторами был проведен большой сравнительный анализ всех DGAT, обнаруженных у водорослей [45], также некоторые сведения об аминокислотных последовательностях данных ферментов были получены при анализе их изоформ у конкретных организмов. По существу, биохимические функции всех типов DGAT сходны, что должно указывать на наличие общих консервативных последовательностей у этих ферментов. Однако оказалось, что они не обнаруживают гомологии последовательностей друг с другом. Так, множественное выравнивание пятидесяти девяти аминокислотных последовательностей DGAT1, выделенных из 48 организмов, и пятидесяти восьми последовательностей DGAT2 из 44 организмов показало наличие только 2-х консервативных аминокислотных остатков: фенилаланина в положении F225 и пролина в положении P248 [51].

Использованные в разных исследованиях биохимические и биофизические методы, а также *in silico* анализ в совокупности дают довольно четкие представления о пространственной структуре DGAT1. Как правило, это большие белки размером около 500 аминокислотных остатков (а.о.) (табл. 1). Распределение разных типов а.о. в

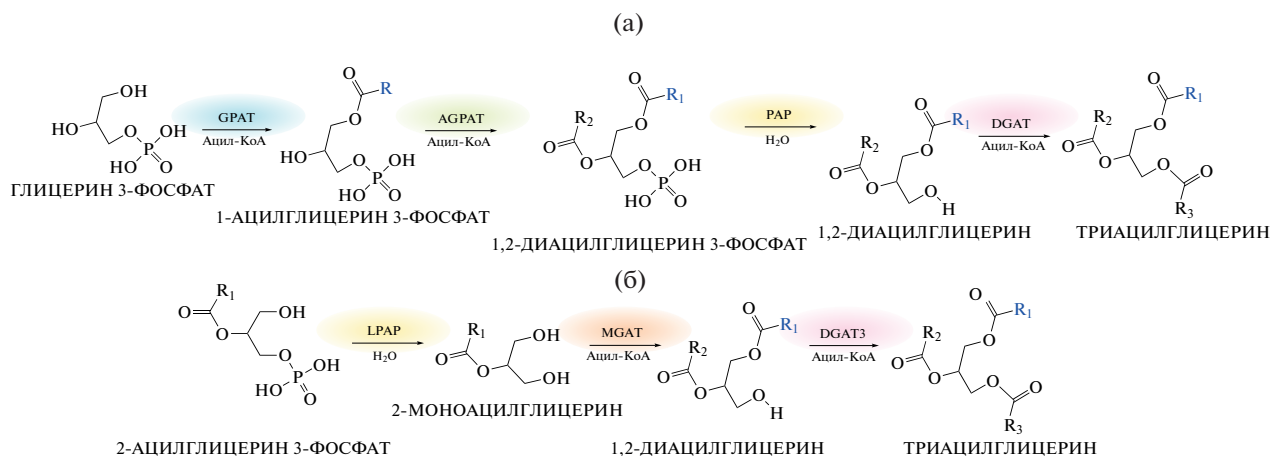


Рис. 1. Схема биосинтеза триацилглицеринов, идущего по пути Кеннеди (а) и по альтернативному цитозольному пути (б). GPAT – глицеро-3-фосфатацилтрансфераза, AGPAT – ацилглицерин-3-фосфатацилтрансфераза, PAP – фосфогидролаза фосфатидной кислоты, DGAT – диацилглицеринацилтрансфераза, LPAP – фосфогидролаза лизофосфатидной кислоты, MGAT – моноацилглицеринацилтрансфераза.

DGAT1 выглядит следующим образом: приблизительно 26% – заряженные а.о. (7% – кислотные остатки, представленные преимущественно глутаминовой и аспарагиновой кислотами; 10% – основные остатки, представленные в основном лизином и аргинином), 25% – нейтрально полярные, и 42% – гидрофобные а.о. [51], что согласуется с мембранным положением фермента. Изученные растительные DGAT1 имеют длинный (около 100 а.о.) гидрофильный N-концевой сегмент, за которым следуют трансмембранные (ТМ) домены, по мнению разных исследователей у растений их количество варьирует от 6 до 10, но всегда четное (рис. 2) [52, 53]. У *B. napus* N-концевой сегмент DGAT1 имеет сайт связывания с ацил-СоА (с 81 по 113 а.о.) [35], однако нахождение данного сайта в цитозоле говорит в пользу того, что он обеспечивает аллостерическое взаимодействие, а не функциональное. Первые 80 а.о. представляют собой так называемый неупорядоченный регуляторный регион (Intrinsically disordered region – IDR [54]), который содержит в себе вероятные участки димеризации и аутоингибирования [55]. Это согласуется с другими исследованиями, отмечающими, что порядка 50% мембранных белков имеют длинные

IDR [56], локализованные в цитоплазме и выполняющие функции регуляции, в том числе ингибирования активности фермента [57], и клеточной сигнализации [58]. Наличие IDR также подтверждает возможность аллостерической регуляции активности DGAT1. Все известные DGAT1 объединяет наличие в IDR кластера аргининовых остатков, который, возможно, важен для регуляции активности фермента [59]. Считается, что N-концевой сегмент целиком закодирован в первом экзоне, всего же большинство DGAT1 растений имеют 16 экзонов [53]. На основе *in silico* анализа аминокислотных последовательностей были предсказаны некоторые функциональные мотивы DGAT, которые пока требуют экспериментального подтверждения (табл. 2). Так, у *B. napus* была описана лейциновая застёжка, состоящая из пяти остатков лейцина, последовательно разделенных семью а.о. (L205, L212, L219, L226 и L233). Полагают, что этот мотив может служить сайтом связывания модулирующих белков или облегчать взаимодействие DGAT1 с другими ферментами в пути биосинтеза ТАГ [35]. В ряде исследований описывались вероятные сайты фосфорилирования DGAT1. Эксперименты по внесению замен в эти сайты показали из-

Таблица 1. Сравнительная характеристика разных типов фермента DGAT

	DGAT1	DGAT2	DGAT3	WS/DGAT	EaDAcT
Размер	515 а.о.	340 а.о.	41 кДа	458 а.о.	42 кДа
Число ТМ-доменов	6–10	1–3	0	0–3	4–5
Количество экзонов	16	5–9	2–3	6–8	–
Локализация в клетке	ЭР, пластиды	ЭР, липидные капли, митохондрии	цитозоль	ЭР	ЭР

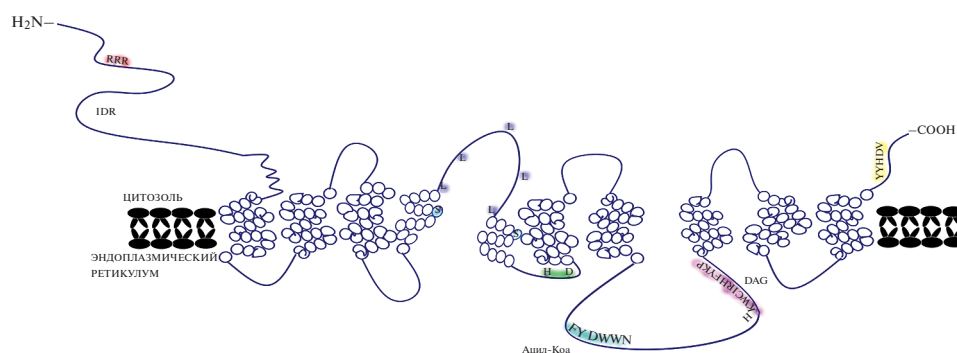


Рис. 2. Модель пространственной структуры DGAT1. Заливкой выделены функционально важные мотивы и аминокислотные остатки. Модель построена по данным [24, 35, 59, 60].

менение активности фермента. Так, у *T. majus* замена серина на аланин в 197 положении приводила к повышению активности DGAT1 [38]. У *B. napus* важным для активности DGAT1 считается также консервативный остаток серина в положении 237 (S237). Остатки S197 и S237 являются аналогичными сайтам фосфорилирования SnRK1 и тирозинкиназы соответственно [35]. Фосфорилирование может оказывать большое влияние на активность DGAT1, поскольку в качестве субстрата для этого фермента выступает DAG, а фосфорилирование определенных а.о. повышает сродство других ферментов с ним [59]. У большинства растительных DGAT1 обнаруживаются консервативные мотивы HxxxD и HxxxxD около 4-го и 5-го ТМ-доменов соответственно, предполагается, что подобная пара гистидина и аспарагиновой кислоты способствует увеличению нуклеофильности гидроксигруппы DAG, облегчая взаимодействие с Ацил-КоА [59]. В то же время у *A. thaliana* описанную функцию выполняет мотив N(S/A/G)R(L/V)(I/F/A)(I/L)EN(L/V), в котором роль гистидина и аспарагиновой кислоты выполняют аргинин и глутаминовая кислота соответственно [29]. В 2011 году Сао с соавторами провели сравнительный анализ аминокислотных последовательностей всех известных DGAT1, который выявил 41 строго консервативный а.о., причем большинство этих а.о. было локализовано в С-концевой области фермента. Эти высококонсервативные а.о. могли указывать на активные сайты, играть важную функциональную роль, в том числе сказываться на субстратной специфичности и/или формировании пространственной структуры молекулы. Позже с помощью моделирования пространственных структур *in silico* было предсказано наличие у DGAT1 из *B. napus* в С-концевой области белка большой внемембранной петли, локализованной в полости ЭР и содержащей два функциональных пептида. Пептид Sit1 (356FG-DREFYRDWVNSES370) включает в себя мотив FYxHWDWN, который является высококонсервативным между ферментами DGAT и ацил-КоА холестеринацилтрансферазой млекопитающих (ACAT),

и, вероятно, отвечает за связывание с ацилом. Пептид Sit2 (379NIPVHKWSIRHFY391) включает предполагаемый диацилглицерин-связывающий мотив HKWCIRHFYKP, обнаруженный ранее в протеинкиназе С и диацилглицеринкиназах (табл. 2). Дальнейшие исследования с помощью SRCD (synchrotron radiation circular dichroism) и флуоресцентной микроскопии подтвердили эти предположения [60]. Анализ топологии DGAT1 показал, что N- и С-концевые области фермента ориентированы в цитоплазму, что подтверждает четное число ТМ-доменов [61]. В 2004 году McCarty с соавторами описали у десатураз жирных кислот несколько С-концевых мотивов, определяющих локализацию ферментов относительно ЭР [62], на основе которых аналогичные мотивы были обнаружены у DGAT1 и DGAT2 [37, 63] (табл. 2). Некоторые важные аминокислотные остатки последовательностей DGAT были определены благодаря изучению естественных мутаций. Так, у *B. napus* замена пролина на аргинин в 216 положении почти полностью ингибировала активность фермента. Также существует мнение, что у *B. napus* аминокислотные замены в 9-м предсказанном трансмембранном домене (PTMD9) приводят к повышению эффективности работы DGAT1 [64]. У кукурузы аллель ASKC281B1 DGAT1-2, ответственный за высокий уровень накопления масла, отличается от аллеля PH09B, ответственного за средний уровень содержания масла, инсерцией фенилаланина в 469 положении. Zheng с соавторами выяснили, что именно этот а.о. играет ключевую роль в повышении содержания масла и концентрации олеиновой кислоты у кукурузы [65]. Интересно отметить, что этот остаток фенилаланина консервативен для растительных DGAT1, но не характерен для одного из DGAT1 животных, а также для DGAT2 [51]. Таким образом, имеющиеся на сегодняшний момент данные позволяют довольно подробно описать локализацию, структуру и вероятные взаимодействия DGAT1, некоторые высказанные ранее предположения были подтверждены

Таблица 2. Выявленные функциональные мотивы ферментов DGAT.

Фермент	Мотив	Функция	Организм	Источник
DGAT1	YUHDV	Локализация на ЭР	<i>Echium</i>	63
	RTRESPLSSDAIFKQSHA	Аллостерическое взаимодействие с Ацил-КоА	<i>B. parvus</i>	24
	FYXDWWN	Взаимодействие с Ацил-КоА	<i>B. parvus</i>	60
	HKWCIRHFYKР	Взаимодействие с DAG	<i>B. parvus</i>	60
	L205, L212, L219, L226, L233	Лейциновая застёжка	<i>B. parvus</i>	35
	HXXXX и HXXXXX	Активный сайт	<i>plants</i>	59
	N(S/A/G)R(L/V)(I/F/A)(I/L)EN(L/V)	Активный сайт	<i>A. thaliana</i>	29
	LKLEI	Локализация на ЭР	<i>V. fordii</i>	37
	FLXLXXXn	Связывание с нейтральными липидами	<i>M. musculus</i>	69
	RXKXXXK	Митохондриальный сигнал	<i>M. musculus</i>	69
DGAT2	YFP	Активность фермента	<i>S. cerevisiae</i>	59
	HFP	Активность фермента	<i>R. communis</i>	70
	HPHG	Активный сайт	<i>S. cerevisiae</i>	59
	EPHS	Активный сайт	<i>V. fordii</i>	37
	HVQYYGD KKRVLFDDL HNNAVELFSRNN	Ацилтрансферазные мотивы	<i>A. hypogaea</i>	27
	RKAETMIL	Сайт фосфорилирования	<i>A. hypogaea</i>	27
	RIEYCMGNKCKKSGXXALLXEFERXXGVEVGGCKMGK- CXXXPNV	[2Fe-2S] домен	<i>A. thaliana</i>	72
	HNXXXXG	Активный сайт	<i>A. calcoacetica</i>	46
	HNXLGDG	Активный сайт	<i>A. thaliana</i>	53
	VREKI	Локализация на ЭР	<i>E. alatus</i>	49
WS/ DGAT	SxxxHDxxxxV	Активный сайт	<i>E. alatus</i>	75

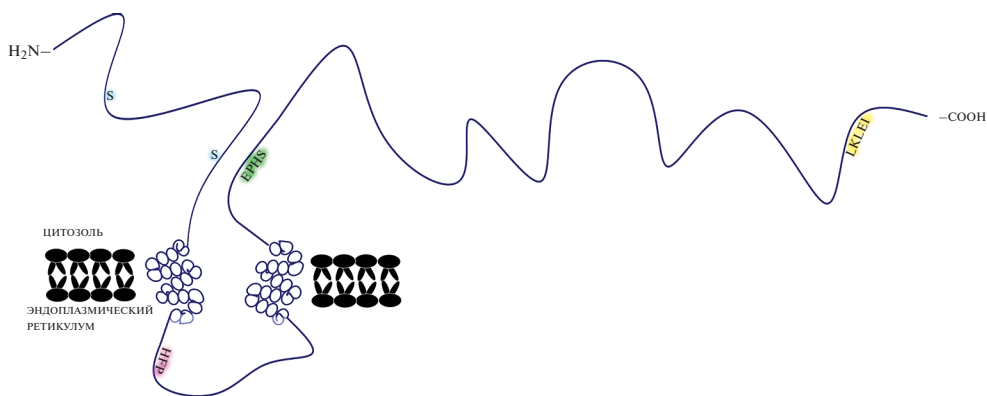


Рис. 3. Модель пространственной структуры DGAT2. Заливкой выделены функционально важные мотивы и аминокислотные остатки. Модель построена по данным [35, 37, 67, 68].

экспериментально, в тоже время ряд тезисов все еще требует детального исследования.

Ферменты типа DGAT2 в сравнении с DGAT1 изучены значительно хуже. Они, как и DGAT1, локализуются в мембране ЭР, а также обнаруживаются в мембранах микросом [41] (табл. 1). Известно, что средний размер DGAT2 составляет 340 а.о., что соответствует разнице в молекулярном весе в 20 кДа по сравнению с DGAT1 [51]. DGAT1 и DGAT2 имеют аналогичные частоты встречаемости а.о. разных функциональных групп, но не гомологичны друг другу. Интересно, что процент гидрофобных а.о. у них тоже примерно равный (42% у DGAT1 и 41% у DGAT2), хотя число ТМ-доменов у большинства известных DGAT2 варьирует от 1 до 4, в то время как у DGAT1 может достигать 10 [51]. Среди всех DGAT2 топология лучше всего изучена у *Saccharomyces cerevisiae*. Ниже мы приводим описание DGAT2, основанное на этой модели, с некоторыми уточнениями относительно DGAT2 растений (рис. 3). Модель DGAT2 *S. cerevisiae*, построенная с помощью методов *in silico*, имела четыре ТМ-домена, а N- и С-концевые области были ориентированы в цитозоль. Аналогичная ориентация наблюдалась у растительного DGAT2 (*V. fordii*), у которого обе концевые области также обращены в цитозоль [37]. Однако анализ степени гидрофобности аминокислотных последовательностей *V. fordii* и *Elaeis guineensis* (пальма масличная) показал, что DGAT2 этих растений с большой вероятностью имеют по два ТМ-домена и длинный С-концевой регион [37, 66]. Про N-концевую область известно, что первые 30–50 а.о. не проявляют каталитической активности и представляют собой неупорядоченный регион [67]. У растений этот регион, возможно, важен для регулирования активности фермента, поскольку у *B. napus* в 25-м положении находится остаток серина, имеющий окружение, аналогичное сайту фосфорилирования SnRK1 киназы ($x_1x_2x_2x_2Sx_2x_2x_2x_1$, где x_1 — гидрофобный

а.о., а x_2 — основной а.о.) [35]. Первый ТМ-домен *S. cerevisiae*, вероятно, охватывает участок от 66 до 97 а.о. и содержит предполагаемый мотив связывания с нейтральными липидами — FVLF. Мотив с такой последовательностью обнаруживается только у *S. cerevisiae*, у млекопитающих ему соответствует последовательность FLxLxxnp (где n неполярный а.о.) [68] (табл. 2). Растения же, вероятно, имеют свою уникальную последовательность липидсвязывающего домена в DGAT2, которая пока не идентифицирована. При этом у *B. napus* в 75 положении находится консервативный остаток серина, который по аналогии с S237 DGAT1 может быть важен для регуляции активности фермента [35]. Интересно отметить, что делеция первого ТМ-домена хоть и приводила к снижению активности фермента, не влияла на ассоциацию ScDGAT2 с микросомальными мембранами, подтверждая предположение, что другие сегменты DGAT2 могут опосредовать взаимодействие с мембранными бислоями. За первым ТМ-доменом следует длинная люменальная петля ЭР, содержащая мотив YFP (рис. 3), замены в котором приводили к значительному снижению активности фермента [59]. Примечательно, что этот мотив консервативен у известных DGAT2, за исключением *R. communis*, у которой данному мотиву соответствует HFP [69]. Здесь важно отметить, что такая длинная люменальная петля характерна для DGAT2 *S. cerevisiae* и не наблюдалась у растений и млекопитающих. За этой областью следуют еще два ТМ-домена, расположенные между остатками 188 и 236. Второй ТМ-домен содержит консервативный мотив HPHG, который, вероятно, важен для каталитической активности фермента, поскольку H195, аналогично консервативному гистидину из DGAT1, может указывать на ДАГ-связывающий мотив [59]. У растений мотив HPHG соответствует мотиву EPHS, который локализуется в свободной С-концевой области (рис. 3), что указывает на отличную от DGAT1 роль DGAT2 в синтезе ТАГ, в частности,

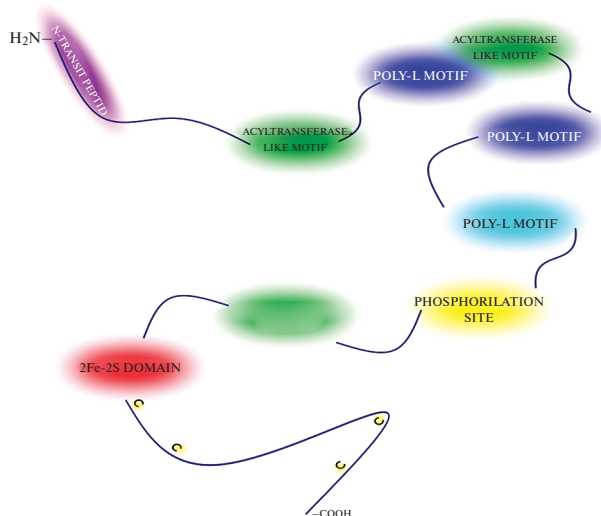


Рис. 4. Схема расположения функциональных мотивов DGAT3. Схема построена по данным [27, 72].

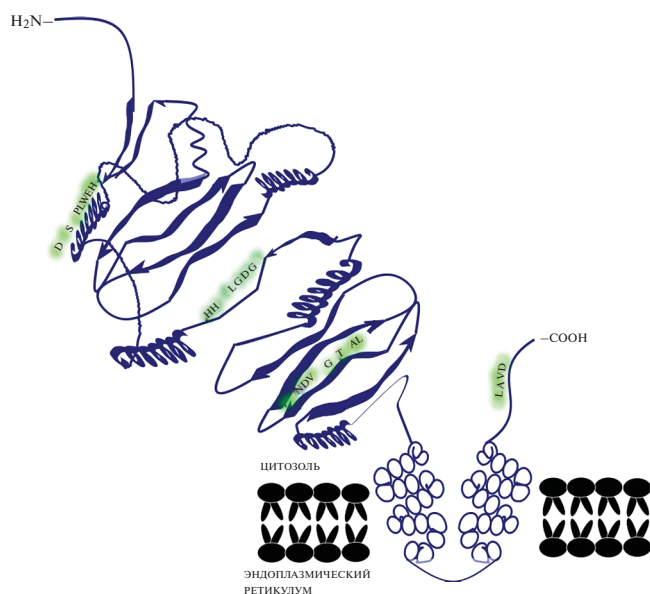


Рис. 5. Модель пространственной структуры WS/DGAT. Заливкой выделены функционально важные мотивы. Модель построена по данным [46, 50, 53].

формирование липидных капель непосредственно в цитоплазме клеток. Четвертый ТМ-домен в своей С-концевой области имеет мотив LKLEI, ответственный за локализацию DGAT2 в ЭР. Такой мотив был обнаружен и у *S. cerevisiae*, и у *V. fordii* [37]. Однако, как упоминалось выше, у растений этот мотив расположен на краю длинного свободного С-концевого участка и не может непосредственно отвечать за локализацию в ЭР, но, по-видимому, важен для более тонкого распознавания клеточным механизмом локализации белков, в

частности для определения в конкретный субдомен ЭР [37]. О потенциальных сайтах связывания DGAT2 с ацил-СоА на данный момент не сообщалось.

DGAT3 имеет размер около 360 а.о. и содержит примерно 31% гидрофобных остатков, на основе анализа расположения которых и отсутствия сигналов локализации в ЭР данный фермент был отнесен к растворимым белкам (табл. 1), а по наличию нескольких частично консервативных мотивов (54HVQYYGD60, 81KKRVLFDDL89, 205HHNAV-ELFSRNND217) – к ацилтрансферазам (табл. 2) [27]. Пространственная структура DGAT3 не известна, несмотря на то, что она лучше, чем у других DGAT, может быть исследована существующими методами. DGAT3 имеет 11 полностью консервативных а.о., причем 10 из них расположены в С-концевой области белка, что говорит о возможной функциональной значимости этого региона (рис. 4) [70]. У DGAT3 было описано несколько потенциально функциональных сайтов: так, у некоторых видов растений первые 35–45 а.о. соответствуют транзитному пептиду хлоропластов [71]; мотив 183RKAETMIL190 гомологичен сайту фосфорилирования тирозинкиназы [27], а мотив, содержащий с 244 по 295 аминокислоты, – домену тиоредоксиноподобных [2Fe-2S]-ферредоксинов [72]. Также исследованные последовательности DGAT3 содержат полисериновый и два полилизиновых региона, функциональная роль которых пока не определена (рис. 4) [73].

WS/DGAT сопоставим по размеру с DGAT1, он также локализован в мембране ЭР и относится к семейству MBOAT, но имеет меньшее число ТМ-доменов (от одного до трех) (табл. 1), а у некоторых гомологов WSD1 (WS/DGAT) из *A. thaliana* не предсказано ни одного ТМ-домена [61]. О пространственной структуре растительных WS/DGAT известно довольно мало. *In silico* анализ показал, что вне зависимости от числа ТМ-доменов белок имеет большую цитозольную N-концевую область, которая включает в себя высококонсервативный мотив NHxLGDG (табл. 2), вероятно являющийся активным сайтом [53]. Для WS/DGAT из *M. aquaeolei* VT8 была получена кристаллическая структура (ID PDB: 6CHJ) [50]. Данный WS/DGAT кристаллизовался в виде димера, у которого N-концевой и С-концевой домены были связаны через α -спиральный линкер. Оба домена состояли из β -листов, окруженных α -спиралями (рис. 5). Несколькими годами ранее для *M. hydrocarbonoclasticus* VT8 *in silico* была построена модель, имеющая большое сходство с упомянутой выше [74]. К сожалению, структура WS/DGAT из *M. aquaeolei* VT8 имела неупорядоченные области, но на данный момент это единственная модель DGAT, построенная с применением физических методов, а не исключительно в результате *in silico* предсказания. В описываемой модели консервативный мо-

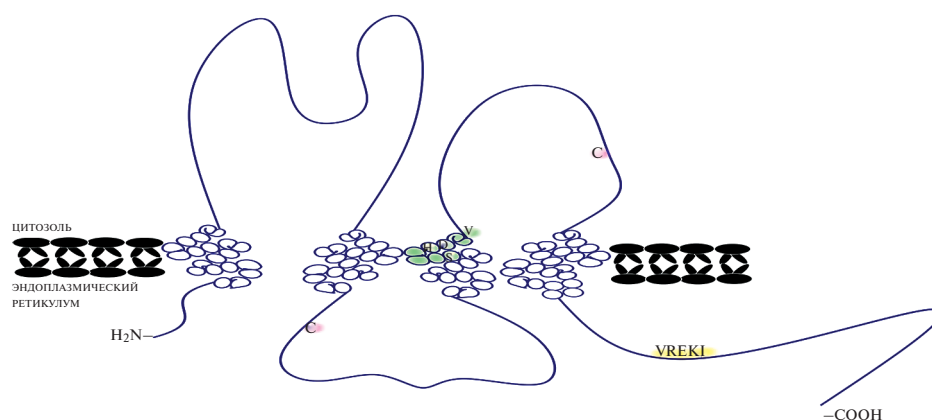


Рис. 6. Модель пространственной структуры DAGT. Заливкой выделены функционально важные мотивы и аминокислотные остатки. Модель построена по данным [49, 75].

тив I35NNxxxDG141 расположен на петле, которая связывает N-концевой домен с α -спиральным линкером (рис. 5), при этом ориентация и пространственное окружение позволяет предположить, что H136 выполняет каталитическую роль, а H135 и D140 – структурную. Описанный мотив находится между двумя полостями, в которых по аналогии с другими трансферазами, по-видимому, и происходит синтез. При анализе последовательностей “выстилающих” эти полости не было выявлено строго консервативных а.о., хотя некоторые исследования указывали, что замены в этом регионе приводили к потере активности WS/DGAT. У *G. max*, *A. thaliana* и *O. sativa* был выявлен ряд консервативных мотивов, но предположить их функциональную роль пока не удалось [53].

DAGT из *Euonymus alatus*, отвечающий за синтез AcДАГ, представляет собой белок массой 42 кДа (табл. 1). В нескольких исследованиях было показано наличие четырех ТМ-доменов, локализованных между 10–30, 157–177, 240–260 и 309–333 а.о. (рис. 6) [75]. Обе концевые области фермента ориентированы в полость ЭР, что отличает EaDAGT от DGAT1 и DGAT2, и N-, и C-регионы которых обращены к цитоплазме. Как было описано выше, свободная N-концевая область способствует аллостерическому взаимодействию DGAT1 и DGAT2 с ацил-CoA, для DAGT и ацетил-CoA подобной зависимости выявлено не было [49]. При этом третий ТМ-домен содержит сигнатуру, характерную для представителей семейства MBOAT (SxxxHDxxxV), активный гистидин которой располагается на границе мембраны с цитозолем, что делает его доступным для ацетил-CoA (табл. 2). Остаток валина (V263), не характерный для других DGAT, в данном сайте, вероятно, выполняет важную структурную функцию. В дополнение к упомянутому мотиву, были выявлены два консервативных цистеина (C187 и C293), замены в кото-

рых приводили к значительному уменьшению активности фермента. DAGT имеет свой собственный мотив локализации в ЭР (табл. 2; рис. 6) [75].

ЭВОЛЮЦИЯ DGAT РАСТЕНИЙ

Экспоненциальный рост данных о последовательностях генов, в том числе и генов *DGAT* из разных видов растений, позволяет проводить филогенетический анализ и на его основе строить гипотезы о происхождении и эволюции этих ферментов. Так, в 2011 году филогенетический анализ аминокислотных последовательностей всех четырех типов DGAT растений показал, что каждый тип фермента образует отдельную кладу на филогенетическом дереве, причем последовательности, относящиеся к классам двудольных и однодольных, образуют в каждой клade отдельные подклады (кластеры) [76]. Филогенетический и эволюционный анализ генов *DGAT1* и *DGAT2* показал, что в процессе эволюции эукариот эти гены произошли за счет функциональной конвергенции [76]. На основе филогенетического анализа всех генов *DGAT3* и *WS/DGAT*, а также предположительно относящихся к этим генам последовательностей, выдвинута гипотеза, что они либо произошли от общего предкового гена до появления высших растений, либо имеют независимое происхождение, как в случае с *DGAT1* и *DGAT2*. В поддержку второго предположения свидетельствуют данные по сравнению последовательностей генов *WS/DGAT* растений и гена *WS/DGAT Acinetobacter calcoaceticu*, которые показали высокую степень идентичности, что свидетельствует о том, что данный тип *DGAT* возник до выхода растений на сушу и подтверждает гипотезу независимого происхождения всех типов *DGAT* [53]. На основании результатов филогенетического анализа было показано, что последовательность ADP1 (*WS/DGAT*) из *Acinetobacter* sp. образует од-

ну подкладу с WS/DGAT *A. thaliana* и предсказанными WS/DGAT других видов растений и водорослей, благодаря чему выдвинуто предположение, что этот тип DGAT образовался до возникновения высших растений. При этом, близкое родство WS/DGAT *Simmondsia chinensis* (симмондсия китайская, хохоба) с последовательностями DGAT1, может указывать и на общее происхождение DGAT1 и WS/DGAT [53].

Следует подчеркнуть, что об эволюции белков можно судить по характеру дупликации их генов, и в этом отношении каждый тип DGAT имеет свои особенности. Так, в исследовании Turchetto-Zolet с соавторами выявлено, что WS/DGAT наиболее вариабельный ген и более двух вариантов его последовательности имеют многие растения: *G. max*, *A. thaliana*, *B. rapa*, *R. communis*, *M. truncatula*, *A. hypogaea*, *O. sativa*, *Z. mays*. Ген DGAT3 присутствует в единственном числе практически у всех растений, за исключением *G. max*, у которой выявлена дупликация этого гена. DGAT1 и DGAT2 представлены двумя и более копиями этих генов у многих растений. Согласно текущему мнению, дупликации генов DGAT, вероятно, произошли уже после отделения группы наземных растений, так как гены всех типов DGAT у водорослей представлены в единственном числе [53].

Анализ последовательностей генов DGAT также свидетельствует о различной эволюционной истории четырех типов фермента. Гены DGAT3, содержат два экзона, исключением являются зеленые водоросли *Volvox carteri*, у которых три экзона, а у мха *Physcomitrella patens* и *Populus trichocarpa* (тополя волосистоплодного), обнаружен недостаток интронов. Гены WS/DGAT большинства видов растений характеризуются высокой консервативностью их структурной организации и имеют семь экзонов (табл. 1). Консервативность структуры WS/DGAT сохраняется даже среди генов с шестью или восемью экзонами, и такие изменения могут быть связаны с утратой или увеличением экзонов в процессе эволюции. Сравнение структурной организации четырех различных типов генов DGAT (DGAT1, DGAT2, DGAT3 и WS/DGAT) из *G. max* и *A. thaliana* выявило различные степени консервативности в структуре этих генов. Гены DGAT1 *G. max* и *A. thaliana* содержат по 16 экзонов, гены DGAT2 – от 5 до 9 экзонов, DGAT3 – 2 и WS/DGAT – 7 экзонов (табл. 1) [53]. Таким образом, экзонно-интронный анализ последовательностей DGAT показал высокую степень консервативности относительно их генной структуры у всех организмов.

ЗНАЧЕНИЕ РАЗНЫХ ТИПОВ DGAT В БИОСИНТЕЗЕ ТРИАЦИЛГЛИЦЕРИНОВ

Имеющиеся исследования позволяют утверждать, что у каждого вида живых организмов имеет-

ся от одного до пяти типов DGAT, при этом некоторые из них могут иметь несколько копий одного гена. Разнообразие DGAT до конца не объяснено, вероятно, такая “избыточность” типов играет компенсационную роль, хотя возможны и более уникальные сценарии. По-видимому, DGAT1 является основным типом DGAT, отвечающим за синтез запасных липидов у большинства организмов. Так, экспрессия гена DGAT1 из *E. alatus* в клетках дрожжей приводила к увеличению содержания ТАГ в 40 раз по сравнению с пустым вектором [77]. У *A. thaliana* обнаружен только один гомолог гена DGAT1 (*At2g19450*), его экспрессия и функциональная роль детально охарактеризована *in planta*. Инактивация DGAT1 приводила к снижению содержания масла в семенах до 40% [78]. Имеющиеся у *A. thaliana* DGAT2, DGAT3 и WS/DGAT, вероятно, страхуют в этой неблагоприятной для семени ситуации, сохраняя количество липидов на приемлемом для выживания и прорастания зародыша уровне. У слизевика *Dictyostelium discoideum* ключевой вклад в синтез ТАГ вносит фермент DGAT1, а не DGAT2, хотя именно DGAT2 специализирован для синтеза ТАГ, в то время как DGAT1 наравне с ТАГ способен синтезировать восковые эфиры и, что особенно необычно, эфиры нейтральных липидов, например, моноалкилмоно- и диацилглицерины. Предполагается, что одновременная активность двух DGAT необходима слизевика для роста на бактериях – его естественном пищевом субстрате [79]. У дрожжей *S. cerevisiae* основной вклад в синтез ТАГ вносит фермент DGAT2 [80], поскольку мутанты, с выключенной экспрессией соответствующего гена, характеризовались меньшей продолжительностью жизни по сравнению с контрольным штаммом. При этом аналогичные опыты на другом виде дрожжей *Yarrowia lipolytica* показали, что определяющую роль в липидном обмене у этого вида играет DGAT1 [81].

Несмотря на различия в строении молекул DGAT1 и DGAT2, их функциональная обособленность до сих пор не до конца ясна. Ряд исследований позволяет предположить, что DGAT1 проявляет субстратную специфичность к насыщенным ЖК, а DGAT2 – к ненасыщенным ЖК, например, в сравнительном исследовании DGAT1 и DGAT2 из *A. thaliana* DGAT1 отдавал предпочтение C16:0, в то время как DGAT2 – C16:1 [82]. Также существует мнение, что DGAT1 отвечает за синтез и накопление ТАГ, содержащих только обычные ЖК, тогда как DGAT2 играет ключевую роль в синтезе липидов у тех растений, в составе ТАГ которых преобладают необычные ЖК [21, 36, 70]. Например, DGAT1 является основным ферментом для накопления масла в семенах *G. max*, в составе ТАГ которой присутствуют только обычные ЖК [83], а *V. fordii* является одним из примеров того, что DGAT2 отвечает за синтез ТАГ у тех видов расте-

ний, в составе ТАГ которых присутствуют необычные жирные кислоты. Масло *V. fordii*, которое широко используется в Китае как сырье для химической и фармацевтической промышленности, а также в качестве источника биотоплива, содержит до 80% ненасыщенной элеостеариновой кислоты, при этом в плодах этого растения одновременно функционируют DGAT1, DGAT2 и DGAT3. Предполагается, что основной вклад в накопление масла у *V. fordii* вносит именно DGAT2, поскольку высокий уровень экспрессии его гена коррелировал с высоким уровнем накопления элеостеариновой кислоты, в то время как уровень экспрессии генов *VfDGAT1* и *VfDGAT3* оставался константным [37, 71, 84]. Сходная взаимосвязь между увеличением экспрессии гена *DGAT2* и содержанием рицинолевой кислоты в масле была показана и у *R. communis* [70, 85]. Активность *DGAT2* на примере *V. fordii* и *R. communis* позволяет говорить о том, что данный тип фермента обладает свойством к большому разнообразию субстратов, т. е. способен ацилировать ДАГ ацилами необычных ЖК. К эксклюзивным функциям *DGAT2* можно отнести активацию синтеза феромонов у *Bombyx mori* (тутовый шелкопряд) [86]. Часто *DGAT2* обнаруживают на мембранах ассоциированных с микротрубочками олеосом, что, возможно, указывает на роль этого фермента в ремоделировании мембран в процессе клеточного роста [87].

Экспериментальные исследования говорят в пользу того, что субстратная специфичность *DGAT* зависит от вида растения. Так, у *A. thaliana* *DGAT1* присоединяет преимущественно ЖК с длинной цепью, а *DGAT1* из *E. guineensis* – ЖК со средней длиной цепи [82]. У *Jatropha curcas* (ятрофа куркас) *DGAT1* вводит в состав ТАГ преимущественно линоленовую кислоту. И экспрессия гена, кодирующего *DGAT1* *J. curcas* (*JcDGAT1*), в гетерологичной системе (*A. thaliana*) приводила не только к увеличению содержания масла, но и изменению соотношения ненасыщенных жирных кислот, а именно: вне зависимости от использованного в конструкции промотора (конститутивный или семя-специфичный) отмечалось увеличение содержания линолевой и линоленовой кислот на 6 и 12% соответственно и снижение уровня олеиновой кислоты на 20%. Отклонений в морфологии семян при этом не наблюдалось [88].

Следует отметить, что различия в биосинтезе запасных липидов характерны не только для разных организмов, но и для разных тканей одного вида. Например, показано, что у растений уровень экспрессии разных генов *DGAT* и их изоформ варьирует в широких пределах в разных тканях, органах и на разных этапах развития, а также в результате действия стрессовых факторов среды. На основе имеющихся экспериментальных данных сложно констатировать строгую ткане-

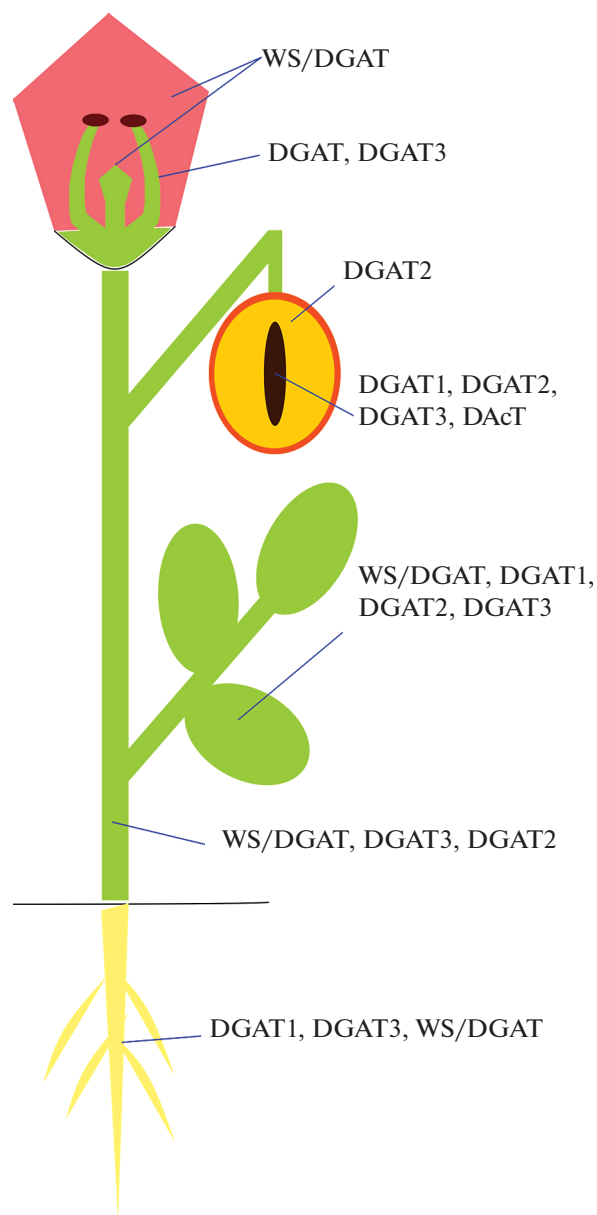


Рис. 7. Схема экспрессии генов *DGAT* в разных органах растений.

органо-специфичность для каждого типа *DGAT*, поскольку это, по-видимому, также зависит от вида растения. В целом можно с определенной долей уверенности утверждать, что гены, кодирующие все типы *DGAT*, функционируют и в генеративных, и в вегетативных органах растения (рис. 7). Так, для *A. hypogaea* показано, что ген *AhDGAT1-2* экспрессируется в корнях, семенах и семядолях, в то время как в органах цветка – *AhDGAT1-1* и *AhDGAT3-3* [73]. У *G. max* экспрессия генов *GmDGAT1*, *GmDGAT2* и *GmDGAT3* выше в семенах, чем в листьях, в отличие от гена *WS/DGAT*, для которого характерен высокий уровень экспрессии в листьях (что согласуется с его основной

функцией – синтезом восков) по сравнению с семенами. Максимальные уровни экспрессии предполагаемых генов *GmDGAT3* характерны для околопучковых мезофильных клеток, клеток палисадной паренхимы, пыльцы, апикальной меристемы, семенной оболочки, одно- и трехлепестных листьев. У *A. thaliana* *AtDGAT1* имеет важное значение для развития пыльцы и семян. *AtDGAT2* может вносить основной вклад в образование ТАГ в вегетативных тканях. Высокий уровень экспрессии *AtDGAT3* отмечен в корне, пыльце, как в молодых, так и в стареющих листьях и ксилеме, а также во время прорастания семян. *WS/DGAT A. thaliana* характерен для клеток женских генеративных органов (лепестки, пестик, семязачаток, плодоножка) [53]. У *E. guineensis* экспрессия *WS/DGAT* на высоком уровне обнаруживалась в клетках эндосперма, мезокарпа, пыльцы, а также корня [67]. У *O. europaea*, одной из немногих плодовых культур, которая накапливает ТАГ не только в семенах, но и в мезокарпии плодов, за накопление ТАГ в семенах ответственен, главным образом, *DGAT1*. А в мезокарпии в течение последних стадий созревания плода, когда ТАГ все еще синтезируются, наблюдается повышение экспрессии *OeDGAT2* на фоне снижения экспрессии *OeDGAT1* [42]. У *E. guineensis* было показано увеличение экспрессии генов *EgDGAT1_1*, *EgDGAT3_1* и *EgWS/DGAT_1* в семенах по сравнению с мезокарпием [67]. Для 14 видов из рода *Euonymus* было показано, что на стадии зрелого плода семена содержат около 5% ТАГ, а на долю АсДАГ приходится до 95% запасных липидов, в то время как в ариллусах наблюдается обратное соотношение между этими молекулярными видами ТАГ [15, 89], это, по-видимому, свидетельствует о том, что в разных частях плода *Euonymus* за накопление разных типов запасных липидов отвечают ферменты разных типов DGAT. Следует отметить, что в целом изменение уровня экспрессии генов, кодирующих разные типы DGAT, в процессе онтогенеза коррелирует в первую очередь с накоплением тех или иных ТАГ в составе запасных липидов. Так, например, у *A. hypogaea* уровень экспрессии *AhDGAT1-1* повышается в процессе формирования семян и достигает максимума на конечных стадиях развития [73]. Однако в исследовании, проведенном на *R. communis*, обнаружилась совершенно иная тенденция, а именно: когда уровень экспрессии *DGAT1 R. communis* достигал максимума (между 19 и 26 днями после опыления), соответствующий фермент выявлялся только на 47–54 день после опыления [90]. Тот факт, что накопление транскрипта значительно опережает трансляцию фермента указывает на то, что функционирование гена *RcDGAT1* регулируется на пост-транскрипционном уровне. У *A. thaliana*, у которого выявлены четыре типа DGAT, в клетках за-

родыша и эндосперма не была обнаружена экспрессия генов *AtDGAT3* и *WS/DGAT* [42].

Как отмечено выше, уровень экспрессии разных генов DGAT может варьировать в результате действия стрессовых факторов среды. Например, гомологи гена *DGAT2* у *Candida tropicalis* могут быть ответственны за повышение накопления запасных ТАГ в условиях недостатка азота [91]. Среди растений было обнаружено, что экспрессия *DGAT1* коррелирует с толерантностью к холоду у линий *B. stricta* [92].

Исследования по экспрессии дополнительной копии генов DGAT, выполненные на насекомых, млекопитающих, клетках дрожжей, водорослей и растениях, показали, что уровень экспрессии различных DGAT у живых организмов влияет на накопление и состав ТАГ. Например, экспрессия гена *DGAT1* из *A. thaliana* в табаке и клетках дрожжей достоверно увеличивала содержание ТАГ у трансформантов [93]. Гены *DGAT1 A. thaliana (AtDGAT1)* и *B. napus (BnDGAT1)* экспрессировали под контролем семя-специфичного промотора в семенах трансгенных растений *B. napus*. При этом ген *AtDGAT1* экспрессировали в растениях *B. napus* сорта Quantum, а ген *BnDGAT1* – в двойной гаплоидной линии DH12075 *B. napus*. Обе линии трансформантов растений продемонстрировали повышение содержания масла от 2.5 до 7% от массы сухого зерна, как в вегетационном опыте, так и в полевых испытаниях [94]. Экспрессия синтетической последовательности гена *EaDacT* под контролем семя-специфичного промотора в *A. thaliana* привела к увеличению содержания АсДАГ, которые составили 40% от общего количества ТАГ в масле семян *A. thaliana* [15]. Экспрессия дополнительной копии гена *PtDGAT2* в водоросли *Phaeodactylum tricornerutum* стимулировала образование большего количества олеосом и повышала содержание нейтральных липидов на 35%. Анализ состава ЖК при этом показал значительное увеличение доли полиненасыщенных ЖК [95]. Экспрессия гена *DGAT2* из микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* в *A. thaliana* увеличивала уровень ТАГ, содержащих ЖК с очень длинной цепью (C24:0), в листьях [96]. Таким образом, многочисленные экспериментальные данные подтверждают, что уровень экспрессии различных DGAT у живых организмов влияет на накопление и состав ТАГ. Следует подчеркнуть, что эффективная экспрессия дополнительной копии гена DGAT у сельскохозяйственных культур открывает возможность для производства масел с измененными свойствами и тем самым способствует удовлетворению потребностей различных отраслей промышленности. Управление уровнем экспрессии генов ключевых ферментов пути Кеннеди на сегодняшний день является наиболее успешной стратегией по модификации количественного и качественного состава запасных ли-

пидов у *B. napus*, *A. thaliana* и *Nicotiana tabacum* (табак обыкновенный).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Липиды и масла, получаемые из растений, являются основным источником жирных кислот в рационе человека и составляют большую часть ежедневно потребляемого калоража, а также источником химического сырья для различных отраслей промышленности и основой для получения высокоэнергетических биопродуктов. Фундаментальные исследования в отношении механизмов регуляции липидного обмена растений в сочетании с достижениями в области синтетической биологии делают возможным моделирование качественного и количественного состава липидов растений, т. е. обеспечивать возможность синтеза липидов с желательными биологическими, физическими и химическими свойствами. И хотя определенные успехи в этом направлении уже сделаны, дополнительные фундаментальные исследования все же требуют целостного подхода, поскольку многие вопросы метаболизма липидов, такие как сложность ацильного обмена и ремоделирование липидов, характеристика ортологичных ферментов для модификации липидов, доступность и локализация множественных пулов липидных субстратов в субклеточных компартментах и перемещение этих липидных составляющих между органеллами остаются мало изученными. Идентификация генов, кодирующих ферменты липидного метаболизма, в частности, DGAT, понимание их эволюционной истории у разных видов растений представляют собой важный шаг для полного знания потенциала DGAT в метаболической инженерии липидов, в частности, и биотехнологии растений, в целом. Хотя гены *DGAT1*, *DGAT2*, *DGAT3*, *WS/DGAT* и *DAT* кодируют ферменты, которые выполняют общую функцию в образовании ТАГ, они могут иметь различающиеся картины экспрессии у разных видов растений, а также в разных органах и тканях у одного и того же вида. До сих пор мало известно о механизмах действия DGAT в синтезе ТАГ необычного состава. Существуют проблемы и в понимании эволюции растительных DGAT, поскольку крайне недостаточно данных о последовательностях генов *DGAT1*, *DGAT2*, *DGAT3*, *WS/DGAT* и *DAT* для большинства видов растений (в том числе не масличных), происхождении каждого типа генов в отдельности и взаимоотношении эволюционных путей всех типов DGAT в целом. Для преодоления недостатка знаний о метаболизме растительных липидов требуется использовать комплексный подход, включающий современные биохимические, молекулярные и биоинформатические методы исследования. Новые акценты в характеристике тонкого механизма липидного обмена у растений, а также применение

улучшенных технологий редактирования геномов и генов в будущем позволят исследователям контролировать и целенаправленно управлять метаболизмом липидов у растений, и эти знания и технологии сделают возможным получать растительные масла со строго заданными физико-химическими свойствами.

Работа выполнена в рамках научного проекта, при финансовой поддержке госзадания 0106-2019-0002 и при поддержке Российского научного фонда в рамках реализации проекта 17-74-10127 “Особенности функционирования растительных *sn*-1,2-диацил-3-ацил-трансфераз с различной субстратной специфичностью”.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. База данных статистической информации (2001). <https://www.statista.com/statistics/263978/global-vegetable-oil-production-since-2000-2001/> Cited 27 January 2021.
2. База данных информации о биодизеле (2021). <http://biodiesel.org/production/production-statistics>. Cited 7 May 2021.
3. Сайт Министерства сельского хозяйства США, служба экономических исследований (2021). <https://www.ers.usda.gov/data-products/us-bioenergy-statistics/> Cited 20 April 2021.
4. Сайт Министерства сельского хозяйства США (2021). <http://usda.mannlib.cornell.edu/MannUsda/viewDocumentInfo.do?documentID=1290>. Cited 7 May 2021.
5. Zweytick D., Athenstaedt K., Daum G. Intracellular lipid particles of eukaryotic cells // *Biochim. Biophys. Acta*. 2000. V. 1469. P. 101. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00294-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00294-7)
6. Верещагин А. Г. Биохимия триглицеридов. Москва: Наука, 1972. 308 с.
7. Rezanka T., Lukavsky J., Nedbalova L., Sigler K. Production of structured triacylglycerols from microalgae // *Phytochemistry*. 2014. V. 104. P. 95. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2014.04.013>
8. Mu H., Porsgaard T. The metabolism of structured triacylglycerols // *Prog. Lipid Res.* 2005. V. 44. P. 430. <https://doi.org/10.1016/J.PLIPRES.2005.09.002>
9. Kubow S. The influence of positional distribution of fatty acids in native, interesterified and structure-specific lipids on lipoprotein metabolism and atherogenesis // *J. Nutr. Biochem.* 1996. V. 7. P. 530. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(96\)00106-4](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(96)00106-4)
10. Quinlan P., Moore S. Modification of triglycerides by lipases: process technology and its application to the production of nutritionally improved fats // *Inform.* 1993. V. 4. P. 580.
11. Takeuchi H., Kasai M., Taguchi N., Tsuji H., Suzuki M. Effect of Triacylglycerols Containing Medium- and

- Long-Chain Fatty Acids on Serum Triacylglycerol Levels and Body Fat in College Athletes. // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2002. V. 48. P. 109.
<https://doi.org/10.3177/jnsv.48.109>
12. Kunesova M., Braunerova R., Hlavaty P., Tvrzicka E., Stankova B., Skrha J., Hilgertova J., Hill M., Kopecky J., Wagenknecht M., Hainer V., Matoulek M., Parizkova J., Zak A., Svacina S. The Influence of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Very Low Calorie Diet during a Short-term Weight Reducing Regimen on Weight Loss and Serum Fatty Acid Composition in Severely Obese Women // *Physiol. Res.* 2006. V. 55. P. 63.
 13. Andrikopoulos N.K. Triglyceride species compositions of common edible vegetable oils and methods used for their identification and quantification // *Food Rev. Int.* 2002. V. 18. P. 71.
<https://doi.org/10.1081/FRI-120003418>
 14. Phillips B.E., Smith C.R. Stereospecific analysis of triglycerides from *Monnina emarginata* seed oil // *Lipids.* 1972. V. 7. P. 215.
<https://doi.org/10.1007/BF02533067>
 15. Durrett T.P., McClosky D.D., Tumaney A.W., Elzinga D.A., Ohlrogge J., Pollard M. A distinct DGAT with sn-3 acetyltransferase activity that synthesizes unusual, reduced-viscosity oils in *Euonymus* and transgenic seeds // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010. V. 107. P. 9464.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1001707107>
 16. Sorensen L.B., Cueto H.T., Andersen M.T., Bitz C., Holst J.J., Rehfeld J.F., Astrup A. The Effect of Salatrim, a Low-Calorie Modified Triacylglycerol, on Appetite and Energy Intake // *Am. J. Clin. Nutr.* 2008. V. 87. P. 1163.
 17. Yang H., Park J., Yoon J., Kim M., Jhon G., Han S., Kim S. Stimulatory effects of monoacyldiglycerides on hematopoiesis // *Biol. Pharm. Bull.* 2004. V. 27. P. 1121.
 18. Jeong J., Kim Y.-J., Yoon S.Y., Kim Y.-J., Kim J.H., Sohn K.-Y., Kim H.-J., Han Y.-H., Chong S., Kim J.W. PLAG (1-Palmitoyl-2-Linoleoyl-3-Acetyl-rac-Glycerol) Modulates Eosinophil Chemotaxis by Regulating CCL26 Expression from Epithelial Cells // *PLoS One.* 2016. V. 11: e0151758.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151758>
 19. Kim Y.-J., Jeong J., Shin S.-H., Lee D.Y., Sohn K.-Y., Yoon S.Y., Kim J.W. Mitigating Effects of 1-Palmitoyl-2-linoleoyl-3-acetyl-rac-glycerol (PLAG) on Hematopoietic Acute Radiation Syndrome after Total-Body Ionizing Irradiation in Mice // *Radiat. Res.* 2019. V. 192. P. 602.
<https://doi.org/10.1667/rr15440.1>
 20. Jeong J., Kim Y.J., Lee D.Y., Moon B.G., Sohn K.Y., Yoon S.Y., Kim J.W. 1-Palmitoyl-2-linoleoyl-3-acetyl-rac-glycerol (PLAG) attenuates gemcitabine-induced neutrophil extravasation // *Medical and Health Sciences 112 Oncology and Carcinogenesis // Cell Biosci.* 2019. V. 9: 4.
<https://doi.org/10.1186/s13578-018-0266-7>
 21. Řezanka T., Schreiberová O., Čejková A., Sigler K. The genus *Dracunculus* – A source of triacylglycerols containing odd-numbered ω -phenyl fatty acids // *Phytochemistry.* 2011. V. 72. P. 1914.
<https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2011.04.020>
 22. Kaneda M., Mizutani K., Takahashi Y., Kurono G., Nishikawa Y. Lilioid A and B – two new glycerol glucosides isolated from *Lilium longifolium* Thunb. // *Tetrahedron Lett.* 1974. V. 15. P. 3937.
 23. Athenstaedt K., Daum G. The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation // *Cell. Mol. Life Sci.* 2006. V. 63. P. 1355.
<https://doi.org/10.1007/s00018-006-6016-8>
 24. Lung S.-C., Weselake R.J. Diacylglycerol acyltransferase: a key mediator of plant triacylglycerol synthesis. // *Lipids.* 2006. V. 41. P. 1073.
 25. Dahlqvist A., Stahl U., Lenman M., Banas A., Lee M., Sandager L., Ronne H., Stymne S. Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: An enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000. V. 97. P. 6487.
<https://doi.org/10.1073/pnas.120067297>
 26. Kennedy E.P. Biosynthesis of complex lipids // *Fed. Proc.* 1961. V. 20. P. 934.
 27. Saha S., Enugutti B., Rajakumari S., Rajasekharan R. Cytosolic Triacylglycerol Biosynthetic Pathway in Oilseeds. Molecular Cloning and Expression of Peanut Cytosolic Diacylglycerol Acyltransferase // *Plant Physiol.* 2006. V. 141. P. 1533.
<https://doi.org/10.1104/pp.106.082198>
 28. Frentzen M. Acyltransferases and triacylglycerols // *Lipid metabolism in plants* / Ed. Moore T.S. Boca Raton: CRC Press Taylor and Francis Group, 1993. P. 195.
 29. Jako C., Kumar A., Wei Y., Zou J., Barton D.L., Giblin E.M., Covello P.S., Taylor D.C. Seed-specific over-expression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight // *Plant Physiol.* 2001. V. 126. P. 861.
 30. Wang H., Guo J., Lambert K.N., Lin Y. Developmental control of *Arabidopsis* seed oil biosynthesis // *Planta.* 2007. V. 226. P. 773.
<https://doi.org/10.1007/s00425-007-0524-0>
 31. Weiss S.B., Kesnedy E.P., Kiyasu J.Y. The Enzymatic Synthesis of Triglycerides // *J. Biol. Chem.* 1960. V. 235. P. 40.
 32. Hofmann K. A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for Wnt signaling // *Trends Biochem. Sci.* 2000. V. 25. P. 111.
[https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01539-X](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01539-X)
 33. Hobbs D.H., Lu C., Hills M.J. Cloning of a cDNA encoding diacylglycerol acyltransferase from *Arabidopsis thaliana* and its functional expression // *FEBS Lett.* 1999. V. 452. P. 145.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00646-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00646-8)
 34. Giannoulia K., Haralampidis K., Poghosyan Z., Murphy D.J., Hatzopoulos P. Differential expression of diacylglycerol acyltransferase (DGAT) genes in olive tissues // *Biochem. Soc. Trans.* 2000. V. 28. P. 695.
<https://doi.org/10.1042/BST0280695>
 35. Nykiforuk C.L., Furukawa-Stoffer T.L., Huff P.W., Sarana M., Laroche A., Moloney M.M., Weselake R.J. Characterization of cDNAs encoding diacylglycerol acyltransferase from cultures of *Brassica napus* and sucrose-mediated induction of enzyme biosynthesis // *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. V. 1580. P. 95.
[https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(01\)00200-1](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(01)00200-1)

36. He X., Turner C., Chen G.Q., Lin J.-T., McKeon T.A. Cloning and characterization of a cDNA encoding diacylglycerol acyltransferase from castor bean // *Lipids*. 2004. V. 39. P. 311.
<https://doi.org/10.1007/s11745-004-1234-2>
37. Shockey J.M., Gidda S.K., Chapital D.C., Kuan J.-C., Dhanoa P.K., Bland J.M., Rothstein S.J., Mullen R.T., Dyer J.M. Tung tree DGAT1 and DGAT2 have nonredundant functions in triacylglycerol biosynthesis and are localized to different subdomains of the endoplasmic reticulum. // *Plant Cell*. 2006. V. 18. P. 2294.
<https://doi.org/10.1105/tpc.106.043695>
38. Xu J., Francis T., Mietkiewska E., Giblin E.M., Barton D.L., Zhang Y., Zhang M., Taylor D.C. Cloning and characterization of an acyl-CoA-dependent diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) gene from *Tropaeolum majus*, and a study of the functional motifs of the DGAT protein using site-directed mutagenesis to modify enzyme activity and oil content // *Plant Biotechnol. J.* 2008. V. 6. P. 799.
<https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00358.x>
39. Sun L., Ouyang C., Kou S., Wang S., Yao Y., Peng T., Xu Y., Tang L., Chen F. Cloning and characterization of a cDNA encoding type 1 diacylglycerol acyltransferase from sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* 2011. V. 66. P. 63.
40. Arroyo-Caro J.M., Mañas-Fernández A., Alonso D.L., García-Maroto F. Type I Diacylglycerol Acyltransferase (MtDGAT1) from *Macadamia tetraphylla*: Cloning, Characterization, and Impact of Its Heterologous Expression on Triacylglycerol Composition in Yeast // *J. Agric. Food Chem.* 2016. V. 64. P. 277.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04805>
41. Zhou X.-R., Shrestha P., Yin F., Petrie J.R., Singh S.P. AtDGAT2 is a functional acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase and displays different acyl-CoA substrate preferences than AtDGAT1 // *FEBS Lett.* 2013. V. 587. P. 2371.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.06.003>
42. Banilas G., Karampelias M., Makariti I., Kourti A., Hatzopoulos P. The olive DGAT2 gene is developmentally regulated and shares overlapping but distinct expression patterns with DGAT1 // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 521.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erq286>
43. Hernández M.L., Whitehead L., He Z., Gazda V., Gilday A., Kozhevnikova E., Vaistij F.E., Larson T.R., Graham I.A. A cytosolic acyltransferase contributes to triacylglycerol synthesis in sucrose-rescued *Arabidopsis* seed oil catabolism mutants // *Plant Physiol.* 2012. V. 160. P. 215.
<https://doi.org/10.1104/pp.112.201541>
44. Rani S.H., Saha S., Rajasekharan R. A soluble diacylglycerol acyltransferase is involved in triacylglycerol biosynthesis in the oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* // *Microbiology*. 2013. V. 159. P. 155.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.063156-0>
45. Bagnato C., Prados M.B., Franchini G.R., Scaglia N., Miranda S.E., Belligni M. V. Analysis of triglyceride synthesis unveils a green algal soluble diacylglycerol acyltransferase and provides clues to potential enzymatic components of the chloroplast pathway // *BMC Genomics*. 2017. V. 18. P. 223.
<https://doi.org/10.1186/s12864-017-3602-0>
46. Kalscheuer R., Steinbüchel A. A novel bifunctional wax ester synthase/acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase mediates wax ester and triacylglycerol biosynthesis in *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1 // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 8075.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M210533200>
47. King A., Nam J.W., Han J., Hilliard J., Jaworski J.G. Cuticular wax biosynthesis in petunia petals: Cloning and characterization of an alcohol-acyltransferase that synthesizes wax-esters // *Planta*. 2007. V. 226. P. 381.
<https://doi.org/10.1007/s00425-007-0489-z>
48. Li F., Wu X., Lam P., Bird D., Zheng H., Samuels L., Jetter R., Kunst L. Identification of the wax ester synthase/acyl-coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase WSD1 required for stem wax ester biosynthesis in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2008. V. 148. P. 97.
<https://doi.org/10.1104/pp.108.123471>
49. Bansal S., Durrett T.P. Defining the extreme substrate specificity of *Euonymus alatus* diacylglycerol acetyltransferase, an unusual membrane-bound O-acyltransferase // *Biosci. Rep.* 2016. V. 36: e00406.
<https://doi.org/10.1042/BSR20160277>
50. Petronikolou N., Nair S.K. Structural and Biochemical Studies of a Biocatalyst for the Enzymatic Production of Wax Esters // *ACS Catal.* 2018. V. 8. P. 6334.
<https://doi.org/10.1021/acscatal.8b00787>
51. Cao H. Structure-function analysis of diacylglycerol acyltransferase sequences from 70 organisms // *BMC Res. Notes*. 2011. V. 4. P. 249.
<https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-249>
52. Lopes J.L.S., Beltramini L.M., Wallace B.A., Araujo A.P.U. Deconstructing the DGAT1 Enzyme: Membrane Interactions at Substrate Binding Sites. 2015. V. 10: e0124336.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118407>
53. Turchetto-Zolet C.A., Christoff P.A., Kulcheski F.R., Loss-Morais G., Margis R., Margis-Pinheiro M. Diversity and evolution of plant diacylglycerol acyltransferase (DGATs) unveiled by phylogenetic, gene structure and expression analyses // *Genet. Mol. Biol.* 2016. V. 39. P. 524.
<https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0024>
54. Light S., Sagit R., Ekman D., Elofsson A. Long indels are disordered: A study of disorder and indels in homologous eukaryotic proteins // *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. V. 1834. P. 890.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.01.002>
55. Caldo K.M.P., Acedo J.Z., Panigrahi R., Vederas J.C., Weselake R.J., Lemieux M.J. Diacylglycerol Acyltransferase 1 Is Regulated by Its N-Terminal Domain in Response to Allosteric Effectors // *Plant Physiol.* 2017. V. 175. P. 667.
<https://doi.org/10.1104/pp.17.00934>
56. Bürgi J., Xue B., Uversky V.N., Gisou Van Der Goot F. Intrinsic Disorder in Transmembrane Proteins: Roles in Signaling and Topology Prediction // *PLoS One*. 2016. V. 11: e0158594.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158594>
57. Trudeau T., Nassar R., Cumberworth A., Wong E.T.C., Woollard G., Gsponer J. Structure and intrinsic disorder in protein autoinhibition // *Structure*. 2013. V. 21. P. 332.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2012.12.013>

58. Wright P.E., Dyson H.J. Intrinsically Disordered Proteins in Cellular Signaling and Regulation HHS Public Access // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2015. V. 16. P. 18. <https://doi.org/10.1038/nrm3920>
59. Liu Q., Siloto R.M.P., Lehner R., Stone S.J., Weselake R.J. Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase: Molecular biology, biochemistry and biotechnology // Prog. Lipid Res. 2012. V. 51. P. 350. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2012.06.001>
60. Lopes J.L.S., Nobre T.M., Cilli E.M., Beltramini L.M., Araújo A.P.U., Wallace B.A. Deconstructing the DGAT1 enzyme: Binding sites and substrate interactions // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1838. P. 3145. <https://doi.org/10.1016/j.BBAMEM.2014.08.017>
61. Xu Y., Caldo K.M.P., Pal-Nath D., Ozga J., Lemieux M.J., Weselake R.J., Chen G. Properties and Biotechnological Applications of Acyl-CoA:diacylglycerol Acyltransferase and Phospholipid:diacylglycerol Acyltransferase from Terrestrial Plants and Microalgae // Lipids. 2018. V. 53. P. 663. <https://doi.org/10.1002/lipid.12081>
62. McCartney A.W., Dyer J.M., Dhanoa P.K., Kim P.K., Andrews D.W., McNew J.A., Mullen R.T. Membrane-bound fatty acid desaturases are inserted co-translationally into the ER and contain different ER retrieval motifs at their carboxy termini // Plant J. 2004. V. 37. P. 156. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.01949.x>
63. Mañas-Fernández A., Vilches-Ferrón M., Garrido-Cárdenas J.A., Belarbi E.H., Alonso D.L., García-Maroto F. Cloning and molecular characterization of the acyl-CoA:Diacylglycerol Acyltransferase 1 (DGAT1) gene from echium // Lipids. 2009. V. 44. P. 555. <https://doi.org/10.1007/s11745-009-3303-9>
64. Jolivet P., Boulard C., Bellamy A., Larré C., Barre M., Rogniaux H., d'Andréa S., Chardot T., Nesi N. Protein composition of oil bodies from mature Brassica napus seeds // Proteomics. 2009. V. 9. P. 3268. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800449>
65. Zheng P., Allen W.B., Roesler K., Williams M.E., Zhang S., Li J., Glassman K., Ranch J., Nubel D., Solawetz W., Bhatramakki D., Llaca V., Deschamps S., Zhong G.Y., Tarczynski M.C., Shen B. A phenylalanine in DGAT is a key determinant of oil content and composition in maize // Nat. Genet. 2008. V. 40. P. 367. <https://doi.org/10.1038/ng.85>
66. Zhou X.-R., Shrestha P., Yin F., Petrie J.R., Singh S.P. AtDGAT2 is a functional acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase and displays different acyl-CoA substrate preferences than AtDGAT1 // FEBS Lett. 2013. V. 587. P. 2371. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.06.003>
67. Rosli R., Chan P.-L., Chan K.-L., Amiruddin N., Low E.-T.L., Singh R., Harwood J.L., Murphy D.J. In silico characterization and expression profiling of the diacylglycerol acyltransferase gene family (DGAT1, DGAT2, DGAT3 and WS/DGAT) from oil palm, *Elaeis guineensis* // Plant Sci. 2018. V. 275. P. 84. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2018.07.011>
68. Liu Q., Siloto R.M.P., Snyder C.L., Weselake R.J. Functional and topological analysis of yeast acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 2, an endoplasmic reticulum enzyme essential for triacylglycerol biosynthesis // J. Biol. Chem. 2011. V. 286. P. 13115. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.204412>
69. Stone S.J., Levin M.C., Farese R.V. Membrane topology and identification of key functional amino acid residues of murine acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase-2 // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. P. 40273. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607986200>
70. Kroon J.T.M., Wei W., Simon W.J., Slabas A.R. Identification and functional expression of a type 2 acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT2) in developing castor bean seeds which has high homology to the major triglyceride biosynthetic enzyme of fungi and animals // Phytochemistry. 2006. V. 67. P. 2541. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTO-CHEM.2006.09.020>
71. Cao H., Shockey J.M., Klasson K.T., Chapital D.C., Mason C.B., Scheffler B.E. Developmental Regulation of Diacylglycerol Acyltransferase Family Gene Expression in Tung Tree Tissues // PLoS One. 2013. V. 8: e76946. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076946>
72. Aymé L., Arragain S., Canonge M., Baud S., Touati N., Bimai O., Jagic F., Louis-Mondésir C., Briozzo P., Fontecave M., Chardot T. *Arabidopsis thaliana* DGAT3 is a [2Fe-2S] protein involved in TAG biosynthesis // Sci. Rep. 2018. V. 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35545-7>
73. Chi X., Hu R., Zhang X., Chen M., Chen N., Pan L., Wang T., Wang M., Yang Z., Wang Q., Yu S. Cloning and functional analysis of three diacylglycerol acyltransferase genes from peanut (*Arachis hypogaea* L.) // PLoS One. 2014. V. 9. P. 1. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105834>
74. Villa J.A., Cabezas M., de la Cruz F., Moncalián G. Use of limited proteolysis and mutagenesis to identify folding domains and sequence motifs critical for wax ester synthase/acyl coenzyme A:Diacylglycerol acyltransferase activity // Appl. Environ. Microbiol. 2014. V. 80. P. 1132. <https://doi.org/10.1128/AEM.03433-13>
75. Tran T.N.T., Shelton J., Brown S., Durrett T.P. Membrane topology and identification of key residues of Ea-DACt, a plant MBOAT with unusual substrate specificity // Plant J. 2017. V. 92. P. 82. <https://doi.org/10.1111/tpj.13636>
76. Turchetto-Zolet C.A., Maraschin F.S., De Morais G.L., Cagliari A., Andrade C.M.B., Margis-Pinheiro M., Margis R. Evolutionary view of acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase (DGAT), a key enzyme in neutral lipid biosynthesis // BMC Evol. Biol. 2011. V. 11. P. 263. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-263>
77. Milcamps A., Tumaney A.W., Paddock T., Pan D.A., Ohlrogge J., Pollard M. Isolation of a gene encoding a 1,2-diacylglycerol-sn-acetyl-CoA acetyltransferase from developing seeds of *Euonymus alatus* // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 5370. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410276200>
78. Zou J., Wei Y., Jako C., Kumar A., Selvaraj G., Taylor D.C. The *Arabidopsis thaliana* TAG1 mutant has a mutation in a diacylglycerol acyltransferase gene // Plant J. 1999. V. 19. P. 645. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00555.x>

79. Du X., Herrfurth C., Gottlieb T., Kawelke S., Feussner K., Rühling H., Feussner I., Maniak M. Dictyostelium discoideum Dgat2 can substitute for the essential function of Dgat1 in triglyceride production but not in ether lipid synthesis // Eukaryot. Cell. 2014. V. 13. P. 517. <https://doi.org/10.1128/EC.00327-13>
80. Bouvier-Navé P., Benveniste P., Oelkers P., Sturley S.L., Schaller H. Expression in yeast and tobacco of plant cDNAs encoding acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase // Eur. J. Biochem. 2000. V. 267. P. 85. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.00961.x>
81. Zhang H., Damude H.G., Yadav N.S. Three diacylglycerol acyltransferases contribute to oil biosynthesis and normal growth in *Yarrowia lipolytica* // Yeast. 2012. V. 29. P. 25. <https://doi.org/10.1002/yea.1914>
82. Aymé L., Jolivet P., Nicaud J.-M., Chardot T. Molecular Characterization of the *Elaeis guineensis* Medium-Chain Fatty Acid Diacylglycerol Acyltransferase DGAT1-1 by Heterologous Expression in *Yarrowia lipolytica* // PLoS One. 2015. V. 10: e0143113. <https://doi.org/e0143113>. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143113>
83. Li R., Yu K., Hildebrand D.F. DGAT1, DGAT2 and PDAT Expression in Seeds and Other Tissues of Epoxy and Hydroxy Fatty Acid Accumulating Plants // Lipids. 2010. V. 45. P. 145. <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3385-4>
84. Chen Y., Cui Q., Xu Y., Yang S., Gao M., Wang Y. Effects of tung oilseed FAD2 and DGAT2 genes on unsaturated fatty acid accumulation in *Rhodotorula glutinis* and *Arabidopsis thaliana* // Mol. Genet. Genomics. 2015. V. 290. P. 1605. <https://doi.org/10.1007/s00438-015-1011-0>
85. Burgal J., Shockey J., Lu C., Dyer J., Larson T., Graham I., Browse J. Metabolic engineering of hydroxy fatty acid production in plants: RcDGAT2 drives dramatic increases in ricinoleate levels in seed oil // Plant Biotechnol. J. 2008. V. 6. P. 819. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00361.x>
86. Du M., Liu X., Liu X., Yin X., Han S., Song Q., An S. Glycerol-3-phosphate O-acyltransferase is required for PBAN-induced sex pheromone biosynthesis in *Bombyx mori* // Sci. Rep. 2015. V. 5: 8110. <https://doi.org/10.1038/srep08110>
87. Barbosa A.D., Lim K., Mari M., Edgar J.R., Gal L., Sterk P., Jenkins B.J., Koulman A., Savage D.B., Schuldiner M., Reggiori F., Wigge P.A., Siniossoglou S. Compartmentalized Synthesis of Triacylglycerol at the Inner Nuclear Membrane Regulates Nuclear Organization // Dev. Cell. 2019. V. 50. P. 755. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.07.009>
88. Misra A., Khan K., Niranjan A., Nath P., Sane V.A. Overexpression of *JcDGAT1* from *Jatropha curcas* increases seed oil levels and alters oil quality in transgenic *Arabidopsis thaliana* // Phytochemistry. 2013. V. 96. P. 37. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2013.09.020>
89. Sidorov R.A., Zhukov A.V., Pchelkin V.P., Vereshchagin A.G., Tsydendambaev V.D. Content and Fatty Acid Composition of Neutral Acylglycerols in *Euonymus* Fruits // J. Am. Oil Chem. Soc. 2014. V. 91. P. 805. <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2425-2>
90. McKeon T.A., He X. Castor diacylglycerol acyltransferase type 1 (DGAT1) displays greater activity with diricinolein than *Arabidopsis* DGAT1 // Biocatal. Agric. Biotechnol. 2015. V. 4. P. 276. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.01.005>
91. Dey P., Chakraborty M., Kamdar M.R., Maiti M.K. Functional characterization of two structurally novel diacylglycerol acyltransferase2 isozymes responsible for the enhanced production of stearate-rich storage lipid in *Candida tropicalis* SY005 // PLoS One. 2014. V. 9: e94472. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094472>
92. Arisz S.A., Heo J.Y., Koevoets I.T., Zhao T., van Egmond P., Meyer A.J., Zeng W., Niu X., Wang B., Mitchell-Olds T., Schranz M.E., Testerink C. Diacylglycerol acyltransferase1 contributes to freezing tolerance // Plant Physiol. 2018. V. 177. P. 1410. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00503>
93. Xu Y., Chen G., Greer M.S., Caldo K.M.P., Ramakrishnan G., Shah S., Wu L., Lemieux M.J., Ozga J., Weselake R.J. Multiple mechanisms contribute to increased neutral lipid accumulation in yeast producing recombinant variants of plant diacylglycerol acyltransferase 1 // J. Biol. Chem. 2017. V. 292. P. 17819. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.811489>
94. Taylor D.C. Zhang Y., Kumar A., Francis T., Giblin E.M., Barton D.L., Ferrie J.R., Laroche A., Shah S., Zhu W., Snyder C.L., Hall L., Rakow G., Harwood J.L., Weselake R.J. Molecular modification of triacylglycerol accumulation by over-expression of DGAT1 to produce canola with increased seed oil content under field conditions // Botany. 2009. V. 87. P. 533. <https://doi.org/10.1139/B08-101>
95. Niu Y.-F., Zhang M.-H., Li D.-W., Yang W.-D., Liu J.-S., Bai W.-B., Li H.-Y. Improvement of neutral lipid and polyunsaturated fatty acid biosynthesis by overexpressing a type 2 diacylglycerol acyltransferase in marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* // Mar. Drugs. 2013. V. 11. P. 4558. <https://doi.org/10.3390/md11114558>
96. Sanjaya, Miller R., Durrett T.P., Kosma D.K., Lydic T.A., Muthan B., Koo A.J.K., Bukhman Y.V., Reid G.E., Howe G.A., Ohlrogge J., Benning C. Altered Lipid Composition and Enhanced Nutritional Value of *Arabidopsis* Leaves following Introduction of an Algal Diacylglycerol Acyltransferase 2 // Plant Cell. 2013. V. 25. P. 677. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.104752>

УДК 581.1

ДОСТУПНЫЙ АРСЕНАЛ СИСТЕМ CRISPR/CAS ДЛЯ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ РАСТЕНИЙ

© 2022 г. Е. В. Михайлова^а, *, Э. А. Хуснутдинов^а, А. В. Чемерис^а, Б. Р. Кулуев^а

^аИнститут биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Уфимского федерального исследовательского центра
Российской академии наук, Уфа, Россия

*e-mail: mikhele@list.ru

Поступила в редакцию 01.03.2021 г.

После доработки 06.04.2021 г.

Принята к публикации 15.04.2021 г.

В настоящее время наиболее быстрым и эффективным методом получения растений с желаемыми признаками является геномное редактирование CRISPR/Cas. Основное его отличие от традиционной геномной инженерии состоит в том, что редактирование производится в заранее известном месте генома. Поэтому помимо прикладного применения, геномное редактирование все чаще используется в фундаментальных исследованиях функций собственных генов растений. Однако технология CRISPR/Cas до сих пор изучается в большей степени не на растениях, а на бактериальных и животных объектах. Тем не менее, существуют простые в применении системы векторов, содержащие широкий ассортимент элементов для редактирования генома растений, а также регуляции экспрессии целевых генов. От исследователя требуется только выбрать подходящую ему систему и адаптировать ее под свой объект и цели эксперимента. В данной статье представлен подробный обзор возможностей, которые предоставляют доступные на сегодняшний день системы для геномного редактирования растений.

Ключевые слова: геномное редактирование, CRISPR, Cas9, Cas12a, Cas12b, Csy4, Ecl2, геминивирусы, нокаут, нокин

DOI: 10.31857/S0015330322010134

ВВЕДЕНИЕ

Редактирование генома заключается в использовании сайт-специфических эндонуклеаз, распознающих заданный исследователями участок ДНК. Природные нуклеазы осуществляют в этом месте разрыв (“молекулярные ножницы”). Хотя в широком смысле в геномном редактировании могут использоваться также мегануклеазы, эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), и нуклеазы типа “цинковых пальцев” (ZFN) [1–3], именно CRISPR/Cas является наиболее простой, стремительно развивающейся и широко применяемой технологией. И сейчас, говоря о геномном редактировании, чаще всего подразумевают систему CRISPR/Cas. Помимо этого, в CRISPR двуцепочечный разрыв способна осуществлять единственная нуклеаза, распознающая одну гидовую РНК, тогда как в методах ZFN и TALEN требуются две нуклеазы.

Хотя метод CRISPR/Cas и может приводить к нецелевым мутациям, для растений такая проблема не является критичной, и поэтому именно эта технология для растительных объектов обладает

наибольшим потенциалом практического применения. Соя, рыжик посевной, различные газонные травы с отредактированным геномом уже вышли на рынок [4]. Внедрение геномной терапии, а также сельскохозяйственных животных, полученных с помощью CRISPR/Cas, до сих пор не состоялось, несмотря на то, что исследования в этой области ведутся гораздо более интенсивно.

Первые статьи с упоминанием CRISPR датируются 2002 г. [5], и на данный момент их насчитывается более 22 тыс. Однако первые сообщения о геномном редактировании растений с использованием этой технологии появились только в 2013 г. [6–8]. На начало 2021 г. статей по растительной тематике в базе PubMed менее 3 тыс. (рис. 1).

В этой сфере работают некоторые научные коллективы, заинтересованные в большей степени в создании работоспособных геном-инженерных конструкций, которые можно адаптировать под разные задачи, нежели во всестороннем исследовании растений, геном которых удалось отредактировать. К сожалению, созданный ими обширный инструментальный для геномного редакти-

рования остается по большей части вне фокуса внимания физиологов растений, хотя он и имеется в открытом доступе в виде разнообразных систем так называемых “пустых” или “холостых” векторов. Для обмена молекулярно-биологическими разработками в научном сообществе существуют специальные репозитории. Крупнейшим из них является Addgene (<https://www.addgene.org/>). Известны также такие базы как Kerafast (<https://www.kerafast.com/>) и Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) (<https://abrc.osu.edu/>).

De novo создание генно-инженерных конструкций требует времени, большого количества специфических реактивов и оборудования, а также проверки работоспособности на модельных объектах. Поэтому использование готовых, уже проверенных систем позволило бы интенсифицировать исследования растений с редактированным геномом и сократить время их получения. Методом CRISPR/Cas можно добиться как разрушения гена с полной потерей функций, так и точечных мутаций, а также изменения уровня экспрессии без внесения изменений в нуклеотидную последовательность гена. Это дает уникальные возможности по исследованию функций генов растений, геном которых был секвенирован, но не аннотирован полностью, и по выявлению генов, ответственных за хозяйственно-ценные признаки. И хотя в последние годы появилось множество обзоров, объясняющих суть методов геномного редактирования [1, 9–13], а также экспериментальных статей, где генетические конструкции создавались авторами *de novo* [6, 14–20], информация о наработанном за это время доступном инструментарии для геномного редактирования растений до сих пор не была обобщена. Также за последние годы было предложено множество новых способов повышения эффективности геномного редактирования растений.

Цель обзора – обобщение и анализ информации о доступном инструментарии для геномного редактирования растений и его основных элементах, а также об эффективности и перспективах использования каждого из этих элементов в растениях. Он может быть полезен для широкого круга биологов, занимающихся функциональной геномикой, молекулярной и классической физиологией растений.

1. ЭЛЕМЕНТЫ CRISPR/Cas СИСТЕМЫ

Минимальный арсенал для CRISPR-технологии геномного редактирования – это нуклеаза Cas, либо ее модификация, а также гидовая РНК, в составе которой находится невариабельная часть (каркас, scaffold) и спейсер, комплементарный целевому участку генома (протоспейсеру) [3, 13]. В зависимости от класса растений используются промоторы для однодольных либо двудоль-

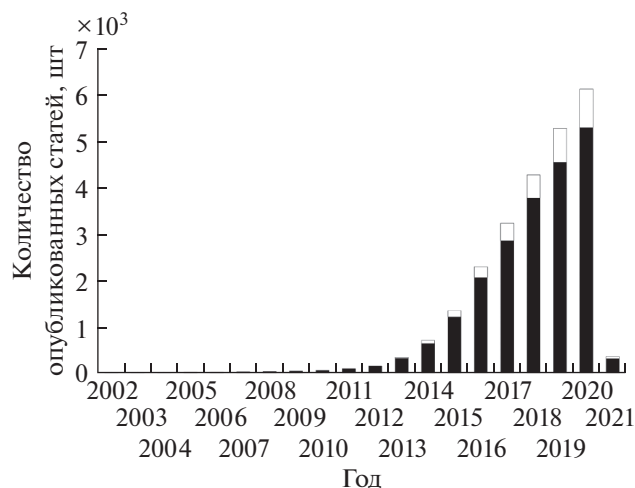


Рис. 1. Доля статей о растениях (выделена белым цветом) среди статей по тематике CRISPR/Cas в 2002–2021 гг., согласно статистическим данным PubMed.

ных, а последовательность гена нуклеазы может быть оптимизирована по кодонному составу в зависимости от объекта. Генно-инженерные конструкции могут включать и другие важные элементы – селективные гены, активаторы и репрессоры, усилители эффективности и специфичности, донорную ДНК. В частности, предложено множество вариантов решения вопроса доставки не одной, а множества гидовых РНК в растение. Во многих системах представлены деактивированные Cas9 (dCas9), соединенные с разнообразными эффекторами для активации либо репрессии транскрипции в заданном месте без образования разрывов. Об эффективности некоторых дополнительных элементов (таких как экзонуклеаза TREX2) при геномном редактировании растений пока мало информации, тогда как по другим (к примеру, активаторам экспрессии VP64 и VPR) накопилось достаточно много экспериментальных данных. Если для нокаута растительных генов в свободном доступе имеется несколько систем векторов, то осуществлять нокин (knock-in, вставку в геном растения донорной ДНК) позволяет пока что только одна (табл. 1). В целом, выбор конкретных векторов для решения собственных прикладных задач требует глубокого понимания назначения и эффективности каждого из их элементов.

Cas-нуклеазы

Показано, что геномное редактирование в растениях можно осуществлять различными типами Cas-нуклеаз. Одним из важнейших их различий, обуславливающих необходимость такого разнообразия, является распознаваемый ими участок PAM (Protospacer Adjacent Motif – мотив, смежный с протоспейсером). Если протоспейсер не

Таблица 1. Некоторые доступные системы для геномного редактирования растений и предоставляемые ими возможности

Авторы систем	Гидовая РНК				Cas										Класс		Промо-торы		Дополнительные элементы Нокин			
	Pol III	Csy4	Рибозимы	tRNA-gRNA	Cas9	dCas	nCas	Cas12a (Cpf1)	Cas12b	CmsI	Репрессия	Активация	Прайм	Редактирование	Однодозные	Двудозные	Сильные	Тканеспецифичные	Вирусные	TREX	Нокин	
Xing et al., 2014 [81]	+				+						+				+	+	+					
Ma et al., 2015 [82]	+				+										+	+	+					
Lowder et al., 2015 [41]	+				+	+	+				+				+	+	+					
Xie et al., 2015 [58]				+	+										+							
Vazquez-Vilar et al., 2016 [42]	+			+	+	+					+				+	+	+					
Cermak et al., 2017 [46]	+	+	+	+	+	+									+	+	+			+		+
Chen et al., 2017 [49]					+											+	+					
Lowder et al., 2017 [43]	+				+	+									+	+	+					
Tang et al., 2017 [23]			+				+								+							
Ordon et al., 2017 [84]	+				+		+									+	+					
Ming et al., 2020 [22]			+		+									+								
Hahn et al., 2020 [21]	+				+										+	+	+					

соседствует с участком PAM, специфичным для данной нуклеазы, то она не работает.

Нуклеаза Cas9 – самая известная и распространенная в геномном редактировании, была впервые позаимствована у бактерии *Streptococcus pyogenes* (SpCas9). У нуклеазы данной бактерии PAM представляет собой последовательность нуклеотидов 5'-NGG, тогда как у *Staphylococcus aureus* это 5'-NNGRRT, а у *Streptococcus thermophilus* – 5'-NRRGAA [21]. Для образования комплекса с Cas9 требуются крПНК (crisp RNA – около 30 нуклеотидов, 20 из которых представляют собой спейсер, определяющий таргетирование) и тракрПНК (trans-activated CRISPR RNA – около 70 консервативных нуклеотидов на 3'-конце), которые обычно объединены в одну sgRNA. Данная нуклеаза образует двуцепочечные разрывы с тупыми концами, а также может образовывать небольшие делеции (1–3 п. н.) [22].

Позже была открыта нуклеаза Cas12a (Cpf1), которая оказалась более подходящей для множественного таргетирования, а также для растений, богатых AT-участками. Она образует более длинные делеции размером 6–13 п. н. [23]. В отличие от Cas9, PAM для этой нуклеазы имеет последовательность 5'-TTTN и находится перед протоспейсером, а не после него. Нуклеаза *Francisella novicida* (FnCpf1) распознает еще более короткий PAM 5'-TTN [24]. Для формирования активного комплекса с Cas12a достаточно только крПНК [16, 23, 25]. Двуцепочечный разрыв же происходит дальше от протоспейсера (в 13–23 п. н.), и оставляет липкие концы, что позволяет более эффективно проводить нокин [26, 27]. Помимо этого, нуклеаза Cas12a допускает меньше нецелевых мутаций [24].

Cas12b (C2c1) – меньшая по размеру нуклеаза, чем предыдущие. Как и Cas12a, она предпочитает T-богатые PAM (5'-TTTN или 5'-TTN) и создает липкие концы в месте двуцепочечного разрыва и более крупные делеции, чем Cas9 (4–14 п. н.) в промежутке от 12 до 24 нуклеотидов после PAM. Cas12b обеспечивает высокую специфичность геномного редактирования, поскольку чувствительна к замене даже одного нуклеотида в последовательности протоспейсера. Как и для Cas9, для работы этой нуклеазы требуется как крПНК, так и тракрПНК. Cas12b *Alicyclobacillus acidiphilus* (AaCas12b) была наиболее эффективна для геномного редактирования риса по сравнению с аналогичными нуклеазами *Alicyclobacillus acidoterrestris* (AacCas12b) и *Bacillus thermoamylovoran* (PAM 5'-ATTN) [22]. Также была показана возможность использования Cas12b на примере хлопчатника [28] и *Arabidopsis thaliana* [20].

Cms1 (Cas12e) – одна из самых маленьких среди изученных нуклеаз, которая, как и Cas12a, нуждается только в крПНК и не требует тракрПНК. Она обнаружена у *Smithella sp.*, *Microgeno-*

mates sp., *Omnitrophica sp.* и *Sulfuricurvum sp.* и распознает AT-богатые PAM (5'-TTN). В отличие от остальных нуклеаз, которые испытывались сначала на клетках животных, Cms1 впервые была опробована именно на растениях, путем биобаллистики каллусов риса [29]. Тем не менее, систем с этой нуклеазой в свободном доступе пока нет (табл. 1).

Оптимальной температурой для работы нуклеазы SpCas9 является 32°C, Cas12a – 28–32°C, Aac-Cas12b – 40°C, AaCas12b – 31°C, что снижает эффективность их применения в растениях [28, 30, 31]. Температурный оптимум для Cms1 пока не определен. В растениях активность Cas12a снижалась также в темноте, тогда как с Cas9 такой зависимости не наблюдалось [27].

Для преодоления ограничений, имеющихся у природных нуклеаз, успешно создаются их модифицированные варианты, в том числе с измененными PAM. Например, создана IspyMacCas9, распознающая последовательность 5'-NAAR; SpCas9-VQR, распознающая последовательности 5'-NGAN и 5'-NGNG; SpCas9-NG, для которой достаточно PAM 5'-NG [30–33]. Разнообразие Cas особенно важно для геномного редактирования растений. Геномы различных видов могут значительно различаться по кодонному составу: по некоторым оценкам, от 43.44% GC в кодирующих участках генома тополя до 55.37% у кукурузы [34]. Таким образом, в зависимости от объекта исследования могут быть использованы нуклеазы, распознающие AT- либо GC-богатые PAM. Кроме того, минимальная температура, обеспечивающая геномное редактирование с природными Cas составляет 28°C, тогда как комфортные условия для наиболее распространенного модельного растения *A. thaliana*, а также многих сельскохозяйственных культур – 20–22°C. Поскольку для животных организмов эта проблема не была актуальна, поиск ее решения начался лишь недавно. Пока что единственным способом повысить эффективность геномного редактирования *A. thaliana* был тепловой стресс при 37°C [35], тогда как низкотемпературные нуклеазы до сих пор не разработаны. Однако у агробактерий, которые чаще всего используются для трансформации растений, тоже есть свой температурный оптимум – около 27°C, поэтому тепловой стресс может негативно влиять на их жизнеспособность и снижать эффективность трансформации. В связи с этим, в экспериментах по геномному редактированию необходимо предусматривать обеспечение температурного режима, необходимого не только для работы Cas, но и для выживания и агробактерий, и самих растений.

Деактивированная Cas-нуклеаза (dCas)

Широко применяемой модификацией Cas, о которой необходимо упомянуть отдельно, явля-

ется ее деактивированная форма, не способная осуществлять двуцепочечный разрыв. Этого добиваются путем внесения точечных мутаций. Для Cas9 это обычно мутация D10A в каталитическом домене RuvC1 и мутация H840A в каталитическом домене HNH. Белок Cas, лишенный эндонуклеазной активности (dCas), остается способным связываться с ДНК. Это свойство позволяет использовать такие деактивированные нуклеазы для программирования транскрипции [36]. Будучи дополненными эффекторными доменами (активаторами либо репрессорами), dCas могут регулировать уровень экспрессии целевых генов. Эффекторы присоединяют к С-концу dCas9. Для этой цели может быть использован как единственный эффектор, так и несколько эффекторов в тандеме [15, 36]. Гидовые РНК при этом подбирают для промоторной области.

Одним из наиболее часто используемых в геномном редактировании растений активаторов транскрипции является VP64 (тетрамер активационного домена вируса герпеса VP16), EDLL (уникальный мотив транскрипционных факторов AP2/ERF *A. thaliana*, активирующих защитную реакцию на стресс), а также тандем активаторов VPR, состоящий из последовательностей VP64, р65 и Rta. Субъединица р65 (RELA, NFKB3) — одна из основных в универсальном факторе транскрипции NF-κB, необходимом для функционирования клетки [15]. RTA — активатор репликации и транскрипции (Replication and Transcription Activator) вируса Эпштейна — Барр [37–40]. Встречаются и другие активаторы, такие как активационный домен фактора теплового шока 1 (HSF). В тандеме с VP64 HSF в 2–3 раза увеличивал экспрессию гена *PAP1 A. thaliana*, и в 2–5 раз — гена *AVP1* вакуолярной пиррофосфатазы *A. thaliana* [15]. Однако если в клетках человека VPR активировал экспрессию в 320 раз лучше, чем VP64, то в растениях такого эффекта получалось достичь только с использованием модифицированных гидовых РНК. С помощью VP64 и EDLL удавалось повысить уровень экспрессии растительных генов в 2–7 раз [41–43], что, однако, не приводило к ожидаемым фенотипическим изменениям. По всей видимости, многое зависит и от выбранного целевого гена: так, с использованием VP64 уровень экспрессии гена *FIS2* (негативного регулятора развития семян до оплодотворения) увеличивался в 200 раз [41], чего не удавалось добиться ни с одним другим геном. При этом тандем VP64-EDLL оказался практически не эффективен в отношении того же гена.

Из репрессоров транскрипции в растениях используются KRAB (домен “цинковых пальцев” человека, от англ. *krüppel-associated box*), SRDX (модифицированный растительный репрессор EAR), BRD (домен репрессии В3 *A. thaliana*) [15]. С использованием SRDX уровень экспрессии ге-

на AtCSTF64 *A. thaliana* снижался на 60%, а дублирующих генов микроРНК miR159A и miR159B — на 60–80% [41]. Содержание транскриптов гена некодирующей микроРНК miR159b удалось снизить в 10 раз [23]. Деактивированная Cas может служить репрессором транскрипции и сама по себе [45].

Для усовершенствования метода использовали множественные гидовые РНК [44], а также присоединение эффекторов не только к dCas, но и к гидовой РНК [41], о чем речь пойдет в соответствующем разделе. Интересно отметить, что эффективность dCas при снижении температуры, по всей видимости, не падает, что было продемонстрировано на примере *A. thaliana* и репрессора dCas12a-SRDX [30].

Деактивированные Cas предоставляют широкие возможности для исследования последствий изменения уровня экспрессии собственных генов растений, а также работы генных сетей. Во многих рассмотренных работах изменение уровня транскриптов гена не оказывало ожидаемого влияния на фенотип растения. Таким образом, использование dCas позволяет выявить гены, вносящие действительно заметный вклад в проявление хозяйственно-ценных признаков у растений.

Никазы (*nCas*)

Cas-никазы разрезают только одну цепь двуцепочечной ДНК благодаря мутации, индуцированной только в одном из двух каталитических доменов белка Cas. Две никазы с парой гидовых РНК используют с целью повышения специфичности редактирования генома. Никазы способны снизить вероятность возникновения нецелевых мутаций в 1500 раз [39, 46]. Тем не менее, CRISPR с использованием никаз теряет одно из преимуществ перед TALEN и ZFN, заключающееся в использовании единственной нуклеазы. В целом, использование двух никаз для геномного редактирования растений встречается в литературе крайне редко [47].

Большее распространение получило другое применение никаз — редактирование оснований (base-editing) и праймированное редактирование (prime editing). Редактирование оснований — вариант системы CRISPR/Cas, в котором достигаются точечные однонуклеотидные замены без создания двуцепочечных разрывов [48]. Для этой цели к никазе присоединяется два фермента с N- и С-концов, соответственно. Первый — цитозиндезаминаза (например, gAPOBEC1), преобразующая цитозин в урацил, который в результате транскрипции и репликации превращается в тимин. Второй — ингибитор урацил-ДНК-гликозилазы, который не позволяет ферментам репарации вырезать урацил из ДНК. При этом на второй цепи никаза делает одноцепочечный разрыв, и

путем репарации заменяет гуанин на аденин. Были созданы также искусственные редакторы аденинов, являющиеся производными аденозиндезаминаз [48]. Редактирование оснований происходит в пределах 3–8 нуклеотидов протоспейсера при использовании Cas9. В целом, сейчас имеются инструменты для редактирования любых оснований [21, 39, 49]. Интересной системой является также EvolvR, где для редактирования оснований к Cas присоединяют ник-транслирующую ДНК полимеразу, которая может производить рандомные точечные мутации в промежутке до 350 п. н. [21, 50].

Праймированное редактирование заключается во внесении направленных изменений в последовательность ДНК – в частности, небольших инсерций и делеций (18–80 п. н.) и точечных мутаций в районе последовательности PAM [51]. Для этого используется никаза, слитая с обратной транскриптазой (природной M-MLV либо ее мутантной формой). Также обязательно используется удлиненная гидовая РНК для праймированного редактирования (регРНК, пргРНК), содержащая в себе донорную последовательность. Спейсер для таргетирования целевой последовательности может находиться как в составе пргРНК, так и быть вынесенным в отдельную гидовую РНК. Несмотря на то, что технология была разработана совсем недавно [51], она сразу же начала интенсивно применяться на растениях, причем в основном однодольных. С использованием кодон-оптимизированных для растений никаз и обратной транскриптазы удалось провести праймированное редактирование клеток риса, пшеницы и томата, однако эффективность оказалась на порядок ниже, чем в клетках человека. В растениях эффективность трансформации и доля растений с ожидаемыми мутациями в геноме оказывалась выше, когда спейсер находился в составе пргРНК, а не отдельной гидовой РНК. В целом, ожидаемые мутации обнаруживались менее чем в 9% трансформантов. Важное значение также имел целевой участок генома. К сожалению, праймированное редактирование в растениях приводит в основном к появлению химер и гетерозигот, у которых изменения в фенотипе могут не наблюдаться, что является существенным препятствием для применения технологии на практике [19, 52–55].

Некоторые хозяйственно-ценные признаки растений ассоциированы с однонуклеотидными заменами: гены устойчивости к гербицидам (*C287*, *ACC-T1*, *ALS*), стрессам (*MPK6*, *RLCK185*, *CERK1*, *Pi-d2*), улучшения азотного питания (*NRT1.1B*, *SLR1*) и урожайности (*SPL14*, *GRF4*, *GRF3*) уже были использованы в качестве мишеней для внесения точечных мутаций [48]. Редактирование оснований и праймированное редактирование таких генов имеют высокий потенциал практического применения.

Гидовые РНК

Поскольку в растениях хозяйственно-ценные признаки могут зависеть от нескольких, часто дублирующих генов, именно для растительных объектов наиболее остро стоит вопрос о том, как одновременно редактировать множество генов. Наиболее сложно дела обстоят с полиплоидами – мягкой пшеницей, рапсом и др. С одной стороны, экспрессионные кассеты слишком большого размера снижают эффективность трансформации. С другой стороны, именно попытка решения этих проблем в значительной степени способствовала бурному развитию методов доставки в растительные клетки множественных гидовых РНК [39].

Если используется единственная гидовая РНК, то она обычно находится под контролем Pol III-промотора (рис. 2а), что накладывает некоторые ограничения. В частности, после Pol III промотора U6 обязательно должен следовать гуанин, тогда как после Pol III промотора U3 – аденин. При наличии только одной гидовой РНК удается получить только небольшие делеции до 14 п. н., тогда как при использовании нескольких гидовых РНК чаще всего возникают крупные делеции между сайтами редактирования, что позволяет более эффективно нокаутить целевой ген [46]. Конструкции, где каждая из нескольких гидовых РНК находится под контролем отдельного Pol III промотора, являются не только громоздкими, но и неудобными для клонирования в них спейсеров, поскольку это нельзя осуществить в одной пробирке. К тому же используемые Pol III промоторы не могут обеспечить тканеспецифичную экспрессию [16].

Более подходящим вариантом решения является полицистронная регуляция экспрессии гидовых РНК. В таком случае все они находятся под контролем одного Pol II (например, 35S CaMV) либо Pol III промотора, что позволяет сократить размер генно-инженерной конструкции [46]. Могут использоваться разные механизмы для дифференциации гидовых РНК (рис. 2б–г): Csy4, рибозимы и тРНК.

CRISPR-ассоциированная эндорибонуклеаза Csy4 из *Pseudomonas aeruginosa*, экспрессируемая вместе с Cas9, распознает и разрезает фрагменты размером 28 п. н. с двух сторон от каждой из гидовых РНК в полицистронной конструкции (рис. 2б). Рибозимы могут разрезать определенные последовательности РНК, в том числе саморасщепляться (рис. 2в). Их располагают с двух сторон от каждой гидовой РНК – например, растительный рибозим типа hammerhead с 5'-конца, а рибозим вирус гепатита типа HDV с 3'-конца [23, 56, 57]. Таким образом, при транскрипции рибозимы осуществляют саморазрезание, высвобождают индивидуальные гидовые РНК, и они попадают в клетку уже в виде отдельных молекул.

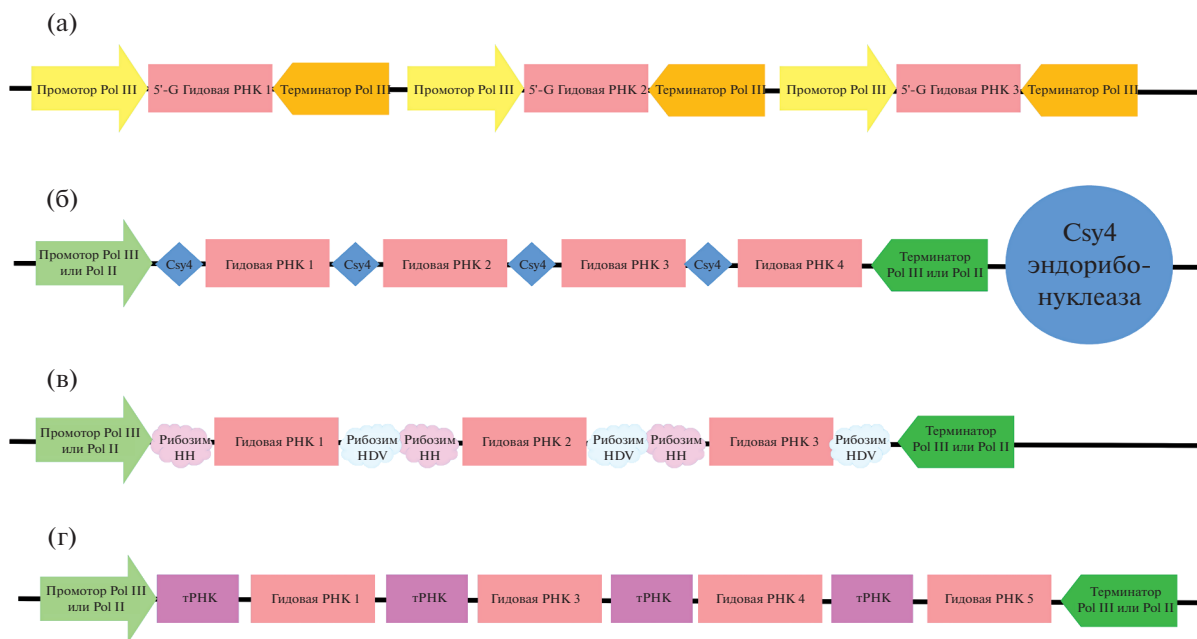


Рис 2. Схематическое изображение множественных гидовых РНК в составе генно-инженерных конструкций: (а) — моноцистронные, (б) — полицистронные, расщепляемые Csy4, (в) — полицистронные, расщепляемые рибозимами, (г) — полицистронные tRNA-gRNA, расщепляемые РНКазами.

Следующий из используемых методов множественного таргетирования — система tРНК-гидовая РНК (рис. 2г). В данном случае последовательности гидовых РНК перемежаются со структурами tРНК (polycistronic tRNA-gRNA — PTG), распознаваемыми РНКазами Р и Z. РНКазы осуществляют разрез, высвобождая гидовые РНК. В отличие от Csy4, эти ферменты присутствуют в клетке, где катализируют процессинг tРНК [58, 59]. Используя Cas12a вместо Cas9, можно еще укоротить полицистронную кассету, поскольку для работы этой нуклеазы достаточно гидовых РНК меньшего размера.

В системах со множественными гидовыми РНК наличие лишних нуклеотидов и другие модификации приводят к снижению способности полицистронных гидовых РНК образовывать комплексы с Cas9 [39]. Тем не менее, показано, что Csy4 и tRNA-gRNA системы в растениях могут быть почти в два раза более эффективными, чем гидовые РНК, имеющие отдельные промоторы, чего нельзя сказать о рибозимных системах [46].

Модифицированные гидовые РНК используются для активации транскрипции наряду с модифицированными Cas. Такая система была названа CRISPR-Act2.0 [43, 44]. Деактивированная нуклеаза dCas9-VP64 повышала экспрессию целевых генов риса (Os03g01240 и Os04g39780) в 3–4 раза эффективнее при использовании гидовой РНК, совмещенной с активатором транскрипции VP64, нежели с обычной гидовой РНК. Для создания гидовой РНК 2.0 эффектор VP64 объединяли с белком

оболочки бактериофага MS2, а в каркас гидовой РНК встраивали шпильку, которая связывалась с этим белком. Такая система повышала экспрессию гена *PAP1A. thaliana* в 30–40 раз, а гена *FIS2* — в 1500 раз, тогда как dCas9-VP64 с обычной гидовой РНК — в 7 и 200 раз, соответственно. Как и в случае с различными модификациями Cas, уровень экспрессии в значительной степени зависел от выбранных гена и эффектора. Когда с dCas9-VP64 использовалась гидовая РНК 2.0 с эффектором EDLL вместо VP64, экспрессия каждого из генов увеличивалась в 30 раз. Для гена *FIS2* это более слабый результат, чем при использовании обычной гидовой РНК. Данная идея получила развитие, когда спонтанная мутация при клонировании привела к появлению гидовой РНК 2.1 [60]. Она была испытана на гомологе гена *DFR* (дигидрофлавонол-4-редуктазы) и транскрипционном факторе *AN2 (Anthocyanin2)* табака *Nicotiana benthamiana*. Авторам удалось достичь повышения активности гена *NbDFR* в 10 тысяч раз, а гена *NbAN2* — в 4 тыс. раз.

Промоторы

Повторение одного и того же промотора в генно-инженерной конструкции является нежелательным, поэтому важно иметь возможность комбинировать разные промоторы [46]. Поскольку генно-инженерные конструкции включают большое разнообразие элементов, становится актуальным вопрос возможности выбора промотора

для каждого из этих элементов, либо их полицистронной экспрессии. В геномном редактировании растений имеет значение еще и вид растения, поскольку для однодольных и двудольных используются специализированные конститутивные промоторы. Для двудольных эффективными считаются 35S CaMV промотор, *pos*-промотор гена *нопалин-синтазы* и *убиквитиновые* промоторы *A. thaliana* (*AtUbi*), *сои* (*GmUbi*) и др., а для однодольных – *убиквитиновый* промотор кукурузы (*ZmUbi*), промотор актина риса (*OsAct*) и др. [46, 61].

Однако конститутивные промоторы не подходят для решения некоторых задач, в частности, трансформации генеративных тканей и зародышей. Методы трансформации *in planta*, когда агробактериями обрабатываются соцветия, применяются во всем мире на *A. thaliana* и родственных ему растениях. При использовании конститутивных промоторов для трансформации *in planta* семенное потомство часто оказывается мозаичным, поскольку инфицирование агробактериями на стадии зиготы может приводить к появлению в тканях растения одновременно трансформированных и нетрансформированных клеток [62, 63]. Использование промотора 35S CaMV приводит в основном к соматическим мутациям и в *сое* [64]. Кроме того, известно, что промотор 35S CaMV демонстрирует слабую активность в яйцеклетках и не начавших делиться зиготах [65].

Использование тканеспецифичных промоторов, которые работают только в растительных яйцеклетках, позволяет значительно повысить эффективность получения гомозиготных трансформантов. Когда экспрессией Cas9 управлял специфичный для яйцеклеток *Ec1.2* промотор *A. thaliana* и использовался терминатор *rbcS E9 Pisum sativum*, в результате трансформации методом погружения цветков удавалось получить 8.3% гомозигот с желаемыми мутациями и только одно мозаичное растение (менее 1%). Однако, когда использовался терминатор *nos*, геномное редактирование оказывалось неэффективным [63]. Специфичные для яйцеклеток промоторы были испытаны на *A. thaliana* (промотор *AtP5p* и синтетический промотор *AtEC1.2e1.1p*, состоящий из *cis*-регуляторных элементов промоторов *AtEC1.1* и *AtEC1.2*) и *сое* (промоторы *GmEC1.1p* и *GmEC1.2p*). Лучше всего проявил себя синтетический промотор *AtEC1.2e1.1p*, примененный для геномного редактирования *A. thaliana* – до 42.9% растений второго поколения сохраняли мутацию, произведенную Cas9. Этот же промотор сработал в *сое*, тогда как остальные три были в ней неэффективны [64].

Для снижения доли химер использовали также специфичный для яйцеклеток промотор *DD45* и специфичный для пыльцы промотор *LAT52*, однако эффективность редактирования оказалась

низкой [65]. Было получено лишь три мутанта с использованием промотора гена *DD45* и ни одного – с промотором гена *LAT52*. Это может быть связано с тем, что в обоих случаях использовался терминатор *nos*, который снижал эффективность редактирования [63]. Наследуемые мутации удавалось получить с использованием конститутивного промотора *RPS5A*, хорошо экспрессирующегося в яйцеклетках. В данной работе использовался терминатор 35S [66].

Использование промотора *YAO*, специфичного для пыльцы и зародышевого мешка, а также активно делящихся тканей, было еще более успешным. Тогда как только 4.3% трансгенных растений первого поколения приобретали желаемую мутацию при использовании промотора 35S CaMV, с промотором *YAO* эффективность геномного редактирования составила 88.5 и 90% в зависимости от нокаутированного гена (*PDS3* и *bri1*, соответственно). Тем не менее, мутация передавалась только 6.67% потомства [67]. Позже на *A. thaliana* были испытаны промоторы *CLAVATA3*, *YAO* и искусственный *EC1.1/EC1.2* с терминатором *rbcS E9* [68]. Многие трансформанты, полученные с использованием промоторов *CLAVATA3* и *YAO*, были нежизнеспособны или стерильны, тогда как при использовании *EC1.1/EC1.2* мутации наследовались в 74% полученных линий.

В другом исследовании удалось произвести нокин гена флуоресцентного белка *GFP* в трансгенные растения *A. thaliana*, экспрессирующие *Cas9* под контролем промотора *DD45*. С использованием других промоторов (*Lat52*, *YAO* и *CDC45*, специфичного для бутонов), а также при трансформации растений дикого типа единой конструкцией, содержащей нуклеазу, гидовую РНК и донорную последовательность, не удалось добиться наследуемых мутаций [69].

Таким образом, наиболее эффективным методом для создания наследуемых мутаций является использование специфичных для яйцеклеток промоторов *EC1.1* и *EC1.2*. Хотя промотор *YAO* и не так хорошо подходит для целей получения чистых линий растений с отредактированным геномом, он может быть эффективно использован для оценки влияния изменения экспрессии гена на фенотип растения в первом поколении.

Интеграция донорной ДНК при помощи гомологичной репарации двухпочечных разрывов (нокин)

После возникновения двухпочечного разрыва, инициируемого Cas нуклеазой, восстановление цепи ДНК происходит в основном с помощью двух механизмов: негомологичной (*non-homologous end joining*, *NHEJ*, *НГСК*) и гомологичной (*homology directed repair*, *HDR*, *ГР*) репарации молекул ДНК

[3, 13, 70]. В первом случае концы соединяются напрямую, часто с образованием небольших инсерций и делеций. Когда в ядре клетки имеется молекула-донор, имеющая гомологию с участком произведенного разрыва, может происходить гомологичная репарация. За счет последнего механизма и осуществляется нокин – вставка донорной последовательности в месте образуемого Cas9 двуцепочечного разрыва. Эта целевая вставка должна быть окружена последовательностями, гомологичными растительной ДНК (“гомологичные плечи”, *homology arms*) с двух сторон от предполагаемого места двуцепочечного разрыва – по 500–1000 п. н. с каждой стороны [14, 47, 70]. Эффективность гомологичной репарации оказывалась выше при более длинных плечах, однако переставала возрастать при длине свыше 1000 п. н. Эта последовательность высвобождается при помощи нуклеазы – для этого она также с двух сторон должна быть окружена мишенями, распознаваемыми гидовой РНК (протоспейсерами) [46, 62, 71]. До сих пор в растениях гомологичная репарация была малоэффективна, что ограничивает возможности геномного редактирования [70, 72]. Несмотря на достаточно универсальный и понятный термин “нокин”, в литературе для обозначения этого процесса чаще используют термины “гомологичная репарация” (HDR), а также “таргетирование гена” (*gene targeting*), которые подразумевают не только вставку чужеродных элементов (промоторов, генов устойчивости и т.д.), но и внесение целенаправленных мутаций в существующий ген с использованием молекулы-донора.

Упоминания об успешном нокине в растениях встречаются намного реже, чем о нокауте. В первых экспериментах по трансформации методом погружения цветков удалось достигнуть только эффективности 0.14% из 1400 семян *A. thaliana*. Обнаружено только две стабильные линии, где произошла интеграция гена устойчивости к канамидину, использованного в качестве донорной ДНК [47]. Успешным оказался эксперимент по встраиванию последовательности CaMV 35S промотора перед геном *ANT1*, задействованным в биосинтезе антоцианов, что позволило значительно повысить уровень экспрессии данного гена [14]. Тем не менее, эффективность трансформации была достаточно низкой: из более чем 200 трансформированных семядолей удалось получить от 6 до 19 каллусов с антоциановой окраской, свидетельствующих о возрастании уровня экспрессии гена *ANT1*, в зависимости от использованной гидовой РНК. В 69% каллусов донорная ДНК встроилась правильно, однако среди 72 регенерированных из этих каллусов растений правильная вставка имелась только у трех, что говорит о генетической неоднородности каллуса. Эта же группа исследователей добилась гомологич-

ной репарации HDR в картофеле [73], осуществив направленную мутацию (замену определенных кодонов) в гене ацетолактат синтазы (*ALS1*), обеспечивающую устойчивость растения к гербицидам. Однако только в одной из восьми полученных линий произошли ожидаемые мутации.

Конститутивный промотор GOS2 методом нокина был поставлен перед геном *ARGOS8* кукурузы, что позволило увеличить продуктивность полученных растений [74]. В данной работе гомологичные плечи имели длину 400 п. н. При использовании единственной гидовой РНК только 1% полученных проростков имел целевую вставку, тогда как при использовании двух гидовых РНК замена нативного промотора на GOS2 наблюдалась у 1.7% проростков.

С использованием SaCas9 и специфичного для яйцеклеток промотора AtEC1.1/1.2 аналогичная мутация в гене *ALS1 A. thaliana* была успешно индуцирована в 6% семян после трансформации *in planta* [69]. Методом биобаллистики произведен нокин в клетках пшеницы с эффективностью от 0.5 до 6.4% в зависимости от использованной генно-инженерной конструкции и редактируемого гена [75]. Растения из трансформированных клеток исследователи не регенерировали. Наиболее эффективными показали себя плазмиды на основе репликонов геминивирусов, которые способны увеличивать эффективность нокина в 10–100 раз [70].

С появлением новых нуклеаз, которые оставляют “липкие” концы (такие как Cas12a), и с использованием не одного, а нескольких вирусных репликонов, а также при нагревании до 31°C, удалось повысить эффективность интеграции промотора CaMV 35S перед геном *ANT1* томата [14] до 4.51% [27]. Эффективность нокин-редактирования гена устойчивости к гигромицину в рисе с использованием Cas12a составила 8% [29], а внесение мутаций в ген *ALS* риса при помощи этой нуклеазы имело эффективность 1.8% [76].

Еще одним способом совершенствования технологии нокина является использование компонентов, повышающих вероятность гомологичной репарации. К таким компонентам относятся экзонуклеазы, которые способствуют отщеплению нуклеотидов на концах двуцепочечного разрыва и предотвращают самолигирование. На растениях были испытаны TREX2 (3 repair exonuclease 2 – 3' репарационная экзонуклеаза 2) и T5 экзонуклеаза (T5exo), объединенные с Cas. В протопластах томата и ячменя вероятность инделов возрастала в 1.5–2.5 раза при использовании TREX2, при этом наблюдались более длинные делеции и инсерции до 42 п. н. Без TREX2 у 77% протопластов томата и 100% протопластов ячменя делеции были меньше 10 п. н., а инсерций вообще не наблюдалось [46]. В протопластах щетинника зеленого

Setaria viridis эффективность CRISPR при использовании TREX2 увеличилась в 1.4 раза, при этом 94% делеций превышали 10 п. н., тогда как инсерций не наблюдалось [77]. При этом большинство делеций произошло благодаря механизму микргомологии репарации (microhomology-mediated end joining – MMEJ). TREX2 позволил достичь доли 73 и 100% регенерантов с желаемыми мутациями в генах *svDrm1a* и *svDrm1b*, соответственно. В полученных с использованием TREX2 волосовидных корнях (hairy roots) картофеля наблюдалась высокая частота мутаций в гене фитоендесатуразы StPDS (98%), в том числе небольшие инсерции, однако они не передавались регенерантам, а частота регенерации была крайне низкой [78]. Экзонуклеаза T5exo увеличивала частоту и размер делеций в протопластах и трансформантах риса, размер делеций достигал 446 п. н. [79]. Доля делеций среди общего числа мутаций выросла в 1.3–4.3 раза, тогда как доля инсерций снизилась.

Сверхэкспрессия факторов HDR, таких как CtIP, CDK1, RS-1, RAD51 и RAD54 (белков, катализирующих гомологичную рекомбинацию), и супрессия ингибиторов NHEJ, таких как SCR7, рассматривается в качестве еще одного механизма повышения эффективности нокин-редактирования растений [70], пока что неприменяемого на практике.

2. СИСТЕМЫ ВЕКТОРОВ

В единичных работах компоненты CRISPR/Cas системы (гидовая РНК и нуклеаза, а иногда и донорная ДНК) доставлялись в растения по отдельности, в том числе, в трансгенные растения, экспрессирующие Cas9 [8, 80]. Но в подавляющем большинстве случаев происходит доставка в растения всех компонентов в составе единой генно-инженерной конструкции [21, 44, 46, 81, 82]. Системы векторов представляют собой разнообразные плазмиды, из которых методами Gateway cloning или Golden Gate (и его производными – Golden Braid и MoClo) составляется единая бесшовная конструкция для геномного редактирования. Если MoClo позволяет с помощью серии реакций Golden Gate собрать единую конструкцию из четырех плазмид разного уровня (модуля) в одной пробирке, то методом Golden Braid плазмиды объединяются попарно. Реже предлагаются готовые единые конструкции, куда необходимо клонировать только ДНК-последовательность спейсера гидовой РНК [46], однако здесь выбор доступных элементов существенно ограничен.

В большинстве случаев элементы CRISPR/Cas системы находятся в составе Т-ДНК, и для успешного редактирования необходима их интеграция в геном растения, которая происходит в случайном месте, что может негативно отражаться на эффективности их экспрессии [83]. Суще-

ственным недостатком здесь является и то, что растения становятся по сути трансгенными, содержащими в своем геноме последовательности гена нуклеазы, гидовой РНК и селективного гена.

Альтернативным, но редко применяемым вариантом является использование модифицированных репликонов геминивирусов (BeYDV – вируса желтой карликовости бобов, ToLCV – вируса курчавости листьев томата, WDV – вируса карликовости пшеницы и др.), находящихся в составе Т-ДНК и содержащих точку начала репликации LIR по обе стороны от последовательности вирусного генома [14, 73, 75]. После попадания Т-ДНК в ядро, вирус реплицируется по типу катящегося кольца, высвобождая все элементы CRISPR/Cas системы [83]. Их количество в клетке может быть до 80 раз выше, чем без использования вирусного репликона, а продолжительность нахождения репликона в клетке достигает восьми недель после агробактериальной трансформации [27]. При этом встраивания в геном (если речь не идет о нокине, где репликоны геминивирусов тоже очень эффективны) не происходит [14], и полученные растения не считаются трансгенными.

Все описанные ниже системы, кроме одной [46], относятся к первому типу (элементы системы встраиваются в геном), а также не позволяют осуществлять нокин. Содержание каждой из них представлено в таблице 1. Некоторые плазмиды для геномного редактирования были заказаны из репозитория более 100 раз, что говорит о высокой потребности научного сообщества в готовых генно-инженерных конструкциях для редактирования растительных генов. Значительное количество цитирований ряда работ свидетельствует о том, что готовые системы векторов могут быть успешно использованы для получения научных результатов.

Одна из наиболее ранних систем Xing с соавт. [81] состоит из 19 плазмид, в которых используются Cas9, оптимизированные для кукурузы, а гидовые РНК находятся под контролем Pol III промоторов как однодольных, так и двудольных. Имеется также и два варианта деактивированной Cas9 – с репрессивным доменом KRAB (pHSN6I01, Addgene plasmid # 50587) и активатором VP64 (pHSN6A01, Addgene plasmid # 50586). На выбор доступен и один из трех маркеров для селекции в растениях – канамицин, гигромицин или фосфинотрицин. Позднее авторы создали маленькую, но достаточно популярную систему с полицистронными tRNA-gRNA под контролем промотора риса snoRNA U3 и Cas9 под контролем убиквитинового промотора риса. Плазмид в системе всего три, они были заказаны также более 100 раз. Выбор можно сделать только между транзientной экспрессией в протопластах и агробактериальной трансформацией [58]. Затем авторы создали пять плазмид для редактирования

оснований у двудольных [49]. Все они содержат nCas9(D10A) под контролем промотора 35S CaMV, каркас gRNA для одного спейсера и один из селективных генов для растений.

Коллективом Ma с соавт. [82] было создано 17 плазмид. Часть из них кодирует кодон-оптимизированную для сем. Злаковых Cas9 (с долей GC 62,5%), промотор 35S CaMV либо убиквитинный промотор кукурузы Pubi, и один из трех селективных генов, часть – каркасы гидовых РНК под контролем Pol III промоторов как однодольных, так и двудольных. С помощью данной системы авторам удалось индуцировать наследуемые мутации в 46 различных участках генома риса, и шести участках генома *A. thaliana*.

Международным коллективом авторов [41] создана система, состоящая уже из 37 плазмид. В ней имеется три модуля Golden gate- и Gateway-совместимых векторов. Ранее описанные системы были не более чем двухмодульными. Первый модуль содержит нуклеазу, никазу либо dCas9, в том числе с активатором и репрессором транскрипции. Второй позволяет клонировать спейсеры гидовых РНК, находящихся под контролем Pol III промоторов. Третий позволяет выбрать промотор, под которым будет экспрессироваться Cas9. Существенным недостатком набора является то, что спейсеры гидовых РНК необходимо сначала клонировать каждый в отдельную плазмиду. В системе не предлагается выбор селективного агента. Также Cas9 оптимизирована по кодонному составу только под *A. thaliana* либо человека.

Коллектив Lowder с соавт. [41] продолжили свою работу, сместив акценты в сторону активации транскрипции – системы CRISPR-Act2.0 [43, 44], новых нуклеаз [22] и праймированного редактирования [23]. Еще одна созданная ими система базируется уже на нуклеазе Cas12b, клонировании Gateway и рибозимном процессинге гидовых РНК [23]. Она содержит 29 плазмид для геномного редактирования однодольных, где на выбор доступны только Cas12b различных бактерий, а также деактивированные нуклеазы с активаторами транскрипции. Созданные Tang с соавт. [55] векторы не могут в полной мере считаться системами. Для осуществления праймированного редактирования доступны только две плазмиды: модуль для клонирования спейсера гидовой РНК и модуль, содержащий никазу.

В системе, созданной Vazquez-Vilar с соавт. [42] методом GoldenBraid можно одновременно использовать до пяти полицистронных гидовых РНК-тРНК. К выбору доступны Cas9, кодон-оптимизированная для человека, а также деактивированная Cas9, активаторы VP64 и EDLL и репрессор BRD. Хотя в статье описываются несколько десятков плазмид, всего 14 из них доступны для заказа. Например, доступен только селективный маркер

устойчивости к канамицину и, что отличает систему от всех прочих, – репортерный ген люциферазы *Renilla reniformis*. Авторами собственная система была проверена только транзитивно.

Коллективом Ordon с соавт. [84] создана система “pDGE Dicot Genome Editing Kit” (Addgene kit # 1000000084) для редактирования генома двудольных, которая была испытана на видах *Nicotiana benthamiana* и *A. thaliana*. Набор содержит 41 плазмиду, поставляемую как в 96-луночном планшете, так и по отдельности. Ранее описанные наборы в планшете не поставлялись. Система позволяет использовать одновременно до восьми гидовых РНК, каждая из которых находится под контролем отдельного промотора AtU6. На выбор предлагаются три стандартных селективных маркера. Из нуклеаз доступна только Cas9, в том числе dCas9 с активатором экспрессии Hax3 и никаза (nCas D10A). В наборе плазмид представлен специфичный для яйцеклеток промотор DD45/EC1.2. Тем не менее, в публикации упор сделан на создании делеций, а возможности использования дополнительных элементов не обсуждаются.

Одной из наиболее масштабных систем, включающих 200 различных плазмид, которые могут быть скомбинированы в зависимости от цели исследования, является многофункциональный кит, созданный в Университете Миннесоты [46]. Эта работа рассчитана не только на систему CRISPR/Cas, но и TALEN, а также включает геминивиральные векторы. Доступны как готовые векторы, куда требуется клонировать только спейсер гидовой РНК (серия p_DIRECT), так и векторы, состоящие из трех приобретаемых отдельно модулей (A, B, C) и остова (p_TRANS – transformation backbone).

Плазмиды модуля A кодируют нуклеазу Cas9 дикого типа, либо никазу, либо dCas9, в том числе с активаторами экспрессии. При этом никазы (D10A и H840A) в системе предназначены не для редактирования оснований, а для создания двух одноцепочечных разрывов, что снижает вероятность нецелевых мутаций. В плазмиды модуля B необходимо клонировать один или несколько спейсеров гидовой РНК, которые могут находиться как под контролем индивидуальных Pol III промоторов, так и полицистронно (с помощью и Csy4, и рибозимов, и тРНК). В плазмиды модуля C можно клонировать донорную ДНК для осуществления нокина. Плазмиды p_TRANS кодируют различные селективные гены для трансформации растений. Одним из существенных преимуществ данной системы, отличающих ее от всех остальных, является возможность осуществления нокина, возможность выбора тканеспецифичных промоторов (EC1.2), а также наличие векторов на основе репликонов вирусов (BeYDV, ToLCV, WDV).

Коллективом Hahn с соавт. [21] был разработан инструментарий для геномного редактирования, состоящий из 95 модульных плазмид, которые можно приобрести комплектом в 96-луночном планшете, а также по отдельности. Набор содержит несколько вариантов нуклеаз из различных видов бактерий (Cas9, оптимизированные для однодольных и двудольных, и Cas12a, оптимизированные только для риса и человека) и редакторы оснований. Любопытно отметить, что плазмиды с нуклеазой Cms1 (pFH18–21), хотя и представлены в статье как часть системы, отсутствуют в репозитории и могут быть получены только по запросу. Для выбора доступны промоторные модули – Pol III (TaU3, OsU3, OsU6 и AtU6) и убиквитиновые и актиновые промоторы Pol II, а также вирусный промотор CmYLCV, изолированный из плазмид Segмак с соавт. [46]. Доступны модули с остовами для спейсеров как индивидуальных, так и полицистронных гидовых РНК (только gRNA-tRNA система). С одной плазмиды можно экспрессировать до 24 гидовых РНК. Хотя данная система содержит наиболее широкий ассортимент нуклеаз, она не позволяет сделать нокин и не содержит dCas с регуляторами экспрессии. Также система еще не успела получить признания – авторами она была протестирована только на протопластах пшеницы, и имеет всего пять цитирований и менее 50 заказов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Геномное редактирование – одна из самых стремительно развивающихся технологий нашего времени, которая позволяет достигнуть множества целей прикладной и фундаментальной науки. Однако практически все новые элементы CRISPR-систем тестируются на клетках животных, а их применение на растительных объектах запаздывает на несколько лет. К примеру, новая нуклеаза Cas12b была открыта в 2015 г., в 2018 г. ее форма, наиболее эффективная при температурах ниже 40°C, была обнаружена и применена на клетках млекопитающих [85], и только в 2020 г. – на растениях [20, 22, 28]. Тем не менее, для геномного редактирования растений разработано большое разнообразие кодон-оптимизированных Cas9, модифицированных Cas9, в том числе деактивированных, никаз, а также распознающих различные варианты PAM [21, 33, 41, 42, 81, 82]. Достаточно хорошо отработаны способы доставки множественных гидовых РНК, что особенно актуально именно для растений [23, 46, 56–59].

Если технология нокаута была успешно опробована уже на многих видах растений, в том числе хозяйственно ценных, то нокин остается сложным и малоэффективным. Тем не менее, возможности нокина шире: именно этот метод позволяет получить растения с принципиально новыми свойствами.

При этом, в отличие от традиционной геномной инженерии, появляется возможность интегрировать донорную ДНК именно в то место генома, где она будет наиболее эффективно работать. Поиск таких регионов проводится только у модельного растения *A. thaliana* [18], но не для сельскохозяйственных растений.

Из ценных хозяйственных растений самым распространенным объектом геномного редактирования является рис, поскольку его геном и методы трансформации хорошо изучены [86]. К популярным объектам относятся также *A. thaliana*, томат, кукуруза, картофель [14, 20, 22, 29, 46, 73], но в целом выбор объекта для геномного редактирования ограничен видами и сортами, геном которых полностью секвенирован. Если ранее гены в растения внедряли “вслепую”, получая обычные трансгенные растения, то для успешного геномного редактирования необходимо знать целевой участок с точностью до нуклеотида. Это существенно осложняет внедрение данной технологии в практику, учитывая сложность растительных геномов, в том числе полиплоидию. Тем не менее, имеются успешные примеры геномного редактирования гексаплоидной пшеницы, во всех трех субгеномах которой удалось нокаутировать шесть аллелей гена *MLO*, чтобы растения стали невосприимчивы к мучнистой росе [87], а также добиться снижения содержания глютена [88]. Высокую практическую значимость имеет также геномное редактирование рапса, который является тетраплоидом, и других хозяйственно ценных растений сем. Капустных. Несмотря на то, что полностью секвенирован геном видов *Brassica napus*, *B. rapa*, *B. oleracea*, *Camelina sativa* и других сельскохозяйственных растений этого семейства, они редко становятся объектами геномного редактирования. По рапсу пока имеется только девять примеров успешного нокаута методом CRISPR/Cas, в одном из которых нокаут всех четырех аллелей гена *BnaMAX1* позволил увеличить урожайность культуры [89].

Таким образом, в области геномного редактирования растений есть множество актуальных направлений исследования, связанных как с совершенствованием технологии CRISPR/Cas, так и с поиском новых генов-мишеней у новых видов растений. Наименее исследованы именно физиологические изменения у растений с отредактированным геномом, поскольку в большинстве рассмотренных работ авторами проводилась только оценка уровня экспрессии генов-мишеней и степень выраженности фенотипических признаков. Однако постоянно увеличивающийся доступный арсенал для геномного редактирования растений позволяет подключиться к работе все большему количеству научных групп, исследовать функции и роль множества растительных генов и создать сорта ценных сельскохозяйственных растений с новыми признаками.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 20-74-10053.

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. Немудрый А.А., Валетдинова К.Р., Медведев С.П., Закиян С.М. Системы редактирования геномов TALEN и CRISPR/Cas инструменты открытий // *Acta Naturae*. 2014. Т. 6. С. 20.
2. Вершинина З.Р., Кулуев Б.Р., Геращенко Г.А., Князев А.В., Чемерис Д.А., Гумерова Г.Р., Чемерис А.В. Эволюция методов редактирования геномов // *Биомика*. 2017. Т. 9. С. 245.
3. Gerasimova S.V., Khlestkina E.K., Kochetov A.V., Shumny V.K. Genome editing system CRISPR/Cas9 and peculiarities of its application in monocots // *Russ. J. Plant Physiol.* 2017. V. 64. P. 141. <https://doi.org/10.1134/S1021443717010071>
4. Waltz E. With a free pass, CRISPR-edited plants reach market in record time // *Nat. Biotechnol.* 2018. V. 36. P. 6. <https://doi.org/10.1038/nbt0118-6b>
5. Jansen R., Van Embden J.D.A., Gastra W., Schouls L.M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes // *Mol. Microbiol.* 2002. V. 43. P. 1565. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
6. Jiang W., Zhou H., Bi H., Fromm M., Yang B., Weeks D.P. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41:e188. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt780>
7. Nekrasov V., Staskawicz B., Weigel D., Jones J.D., Kaimoun S. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. P. 691. <https://doi.org/10.1038/nbt.2655>
8. Shan Q., Wang Y., Li J., Zhang Y., Chen K., Liang Z., Gao C. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. P. 686. <https://doi.org/10.1038/nbt.2650>
9. Bortesi L., Fischer R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond // *Biotechnol. Adv.* 2015. V. 33. P. 41. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.006>
10. Ma X., Zhu Q., Chen Y., Liu Y.G. CRISPR/Cas9 platforms for genome editing in plants: developments and applications // *Mol. Plant.* 2016. V. 9. P. 961. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.04.009>
11. Khlestkina E.K., Shumny V.K. Prospects for application of breakthrough technologies in breeding: the CRISPR/Cas9 system for plant genome editing // *Russ. J. Plant Physiol.* 2016. V. 52. P. 676. <https://doi.org/10.7868/S0016675816070055>
12. Злобин Н.Е., Терновой В.В., Гребенкина Н.А., Таранов В.В. Сделать сложное проще: современный инструментарий для редактирования генома растений // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017. Т. 21. С. 104. <https://doi.org/10.18699/VJ17.228>
13. Кулуев Б.Р., Геращенко Г.А., Рожнова Н.А., Баймиев А.Х., Вершинина З.Р., Князев А.В., Чемерис А.В. CRISPR/Cas редактирование геномов растений // *Биомика*. 2017. Т. 9. С. 155.
14. Cermak T., Baltes N.J., Cegan R., Zhang Y., Voytas D.F. High-frequency, precise modification of the tomato genome // *Genome Biol.* 2015. V. 16. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0796-9>
15. Park J.J., Dempewolf E., Zhang W., Wang Z.Y. RNA-guided transcriptional activation via CRISPR/dCas9 mimics overexpression phenotypes in *Arabidopsis* // *PLoS One*. 2017. V. 12: e0179410. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179410>
16. Xu R., Qin R., Li H., Li D., Li L., Wei P., Yang J. Generation of targeted mutant rice using a CRISPR-Cpf1 system // *J. Plant Biotechnol.* 2017. V. 15. P. 713. <https://doi.org/10.1111/pbi.12669>
17. Герасимова С.В., Короткова А.М., Хертиг К., Хикель С., Хоффи Р., Будхагатапалли Н., Хлесткина Е.К. Применение РНК-направленной нуклеазы Cas9 для сайт-специфической модификации генома в протопластах сибирского сорта ячменя с высокой способностью к регенерации // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019. Т. 22. С. 1033. <https://doi.org/10.18699/VJ18.44>
18. Belavin P.A., Permyakova N.V., Zagorskaya A.A., Marenkova T.V., Sidorchuk Y.V., Uvarova E.A., Rozov S.M., Deineko E.V. Peculiarities in creation of genetic engineering constructions for knock-in variant of genome editing of *Arabidopsis thaliana* cell culture // *Russ. J. Plant Physiol.* 2020. V. 67. P. 855. <https://doi.org/10.855.1134/S1021443720040032>
19. Lin Q., Zong Y., Xue C., Wang S., Jin S., Zhu Z., Gao C. Prime genome editing in rice and wheat // *Nat. Biotechnol.* 2020. V. 38. P. 582. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0455-x>
20. Wu F., Qiao X., Zhao Y., Zhang Z., Gao Y., Shi L., Kong D. Targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using CRISPR-Cas12b/C2c1 // *J. Integr. Plant Biol.* 2020. V. 62. P. 16538. <https://doi.org/10.1111/jipb.12944>
21. Hahn F., Korolev A., Sanjurjo Loures L., Nekrasov V. A modular cloning toolkit for genome editing in plants // *BMC Plant Biol.* 2020. V. 20. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02388-2>
22. Ming M., Ren Q., Pan C., He Y., Zhang Y., Liu S., Qi Y. CRISPR-Cas12b enables efficient plant genome engineering // *Nat. Plants*. 2020. V. 6. P. 202. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0614-6>
23. Tang X., Lowder L.G., Zhang T., Malzahn A.A., Zheng X., Voytas D.F., Qi Y. A CRISPR-Cpf1 system for efficient genome editing and transcriptional repression in plants // *Nat. Plants*. 2017. V. 3. P. 1. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.18>
24. Zaidi S.S-E-A., Mahfouz M.M., Mansoor S. CRISPR-Cpf1: a new tool for plant genome editing // *Trends Plant Sci.* 2017. V. 22. P. 550.

25. *Кулуев Б.Р., Кирьянова О.Ю., Геращенко Г.А., Рожнова Н.А., Гумерова Г.Р., Вершинина З.Р., Чемерис А.В.* Некоторые новшества в CRISPR/Cas геномном редактировании и в смежных областях // Биомика. 2019. Т. 11. С. 315.
<https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2019-27>
26. *Bandyopadhyay A., Kancharla N., Javalkote V.S., Dasgupta S., Brutnell T.P.* CRISPR-Cas12a (Cpf1): a versatile tool in the plant genome editing tool box for agricultural advancement // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11. P. 584151.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.584151>
27. *Vu T.V., Sivankalyani V., Kim E.J., Doan D.T.H., Tran M.T., Kim J., Kim J.Y.* Highly efficient homology-directed repair using CRISPR/Cpf1-geminiviral replicon in tomato // *J. Plant Biotechnol.* 2020. V. 18. P. 2133.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13373>
28. *Wang Q., Alarqi M., Wang F., Li B., Ding X., Rui H., Jin S.* The application of a heat-inducible CRISPR/Cas12b (C2c1) genome editing system in tetraploid cotton (*G. hirsutum*) plants // *J. Plant Biotechnol.* 2020. V. 18. P. 2436.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13417>
29. *Begemann M.B., Gray B.N., January E., Singer A., Kessler D.C., He Y., Oufattole M.* Characterization and validation of a novel group of type V, class 2 nucleases for in vivo genome editing // *bioRxiv.* 2017. P. 1.
<https://doi.org/10.1101/192799>
30. *Malzahn A.A., Tang X., Lee K., Ren Q., Sretenovic S., Zhang Y., Qi Y.* Application of CRISPR-Cas12a temperature sensitivity for improved genome editing in rice, maize, and Arabidopsis // *BMC Biol.* 2019. V. 17. P. 1.
<https://doi.org/10.1186/s12915-019-0629-5>
31. *Schindele P., Puchta H.* Engineering CRISPR/Lb-Cas12a for highly efficient, temperature-tolerant plant gene editing // *J Plant Biotechnol.* 2020. V. 18. P. 1118.
32. *Gao L., Cox D.B., Yan W.X., Manteiga J.C., Schneider M.W., Yamano T., Zhang F.* Engineered Cpf1 variants with altered PAM specificities // *Nat. Biotechnol.* 2017. V. 35. P. 789
<https://doi.org/10.1038/nbt.3900>
33. *Sretenovic S., Yin D., Levav A., Selengut J.D., Mount S.M., Qi Y.* Expanding plant genome-editing scope by an engineered iSpyMacCas9 system that targets a-rich PAM sequences // *Plant Commun.* 2020. V. 2. P. 100101.
<https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100101>
34. *Singh R., Ming R., Yu Q.* Comparative analysis of GC content variations in plant genomes // *Trop. Plant Biol.* 2016. V. 9. P. 136.
<https://doi.org/10.1007/s12042-016-9165-4>
35. *LeBlanc C., Zhang F., Mendez J., Lozano Y., Chatpar K., Irish V.F., Jacob Y.* Increased efficiency of targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 in plants using heat stress // *Plant J.* 2018. V. 93. P. 377.
<https://doi.org/10.1111/tpj.13782>
36. *Chavez A., Scheiman J., Vora S., Pruitt B.W., Tuttle M., Iyer E.P., Church G.M.* Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming // *Nat. Methods.* 2015. V. 12. P. 326.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3312>
37. *Tiwari S.B., Belachew A., Ma S.F., Young M., Ade J., Shen Y., Repetti P.P.* The EDLL motif: a potent plant transcriptional activation domain from AP2/ERF transcription factors // *Plant J.* 2012. V. 70. P. 855.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04935>
38. *Chen K., Wang Y., Zhang R., Zhang H., Gao C.* CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture // *Annu Rev Plant Biol.* 2019. V. 70. P. 667.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100049>
39. *Pandey P.K., Quilichini T.D., Vaid N., Gao P., Xiang D., Datla R.* Versatile and multifaceted CRISPR/Cas gene editing tool for plant research // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2019. V. 96. P. 107.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.04.012>
40. *Shakirova K.M., Ovchinnikova V.Y., Dashinimaev E.B.* Cell reprogramming with CRISPR/Cas9 based transcriptional regulation systems // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020. V. 8. P. 882.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00882>
41. *Lowder L.G., Zhang D., Balthes N.J., Paul J.W., Tang X., Zheng X., Qi Y.* A CRISPR/Cas9 toolbox for multiplexed plant genome editing and transcriptional regulation // *Plant Physiol.* 2015. V. 169. P. 971.
<https://doi.org/10.1104/pp.15.00636>
42. *Vazquez-Vilar M., Bernabé-Orts J.M., Fernandez-Del-Carmen A., Ziarolo P., Blanca J., Granell A., Orzaez D.* A modular toolbox for gRNA-Cas9 genome engineering in plants based on the GoldenBraid standard // *Plant Methods.* 2016. V. 12. P. 10.
<https://doi.org/10.1186/s13007-016-0101-2>
43. *Lowder L.G., Paul J.W., Qi Y.* Multiplexed transcriptional activation or repression in plants using CRISPR-dCas9 based systems // *Methods Mol. Biol.* 2017. V. 1629. P. 167.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7125-1_12
44. *Lowder L.G., Zhou J., Zhang Y., Malzahn A., Zhong Z., Hsieh T.F., Qi Y.* Robust transcriptional activation in plants using multiplexed CRISPR-Act2.0 and mTALE-Act systems // *Mol. Plant.* 2018. V. 11. P. 245.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.11.010>
45. *Bikar D., Jiang W., Samai P., Hochschild A., Zhang F., Marraffini L. A.* Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. P. 7429.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt520>
46. *Cermak T., Curtin S.J., Gil-Humanes J., Čegan R., Kono T.J., Konecna E., Voytas D.F.* A multipurpose toolkit to enable advanced genome engineering in plants // *Plant Cell.* 2017. V. 29. P. 196.
<https://doi.org/10.1105/tpc.16.00922>
47. *Schiml S., Fauser F., Puchta H.* The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for in planta gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in Arabidopsis resulting in heritable progeny // *Plant J.* 2014. V. 80. P. 1039.
<https://doi.org/10.1111/tpj.12704>
48. *Mishra R., Joshi R.K., Zhao K.* Base editing in crops: current advances, limitations and future implications // *Plant Biotechnol. J.* 2020. V. 18. P. 20.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13225>
49. *Chen Y., Wang Z., Ni H., Xu Y., Chen Q., Jiang L.* CRISPR/Cas9-mediated base-editing system effi-

- ciently generates gain-of-function mutations in Arabidopsis // *Sci China Life Sci.* 2017. V. 60. P. 520. <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9021-5>
50. Halperin S.O., Tou C.J., Wong E.B., Modavi C., Schaffer D.V., Dueber J.E. CRISPR-guided DNA polymerases enable diversification of all nucleotides in a tunable window // *Nature.* 2018. V. 560. P. 248. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0384-8>
 51. Anzalone A.V., Randolph P.B., Davis J.R., Sousa A.A., Koblan L.W., Levy J.M., Liu D.R. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA // *Nature.* 2019. V. 576. P. 149. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4>
 52. Hua K., Jiang Y., Tao X., Zhu J.K. Precision genome engineering in rice using prime editing system // *Plant Biotechnol. J.* 2020. V. 18. P. 2167. <https://doi.org/10.1111/pbi.13395>
 53. Xu R., Li J., Liu X., Shan T., Qin R., Wei P. Development of a plant prime editing system for precise editing in the rice genome // *Plant Commun.* 2020. V. 1. P. 100043. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100043>
 54. Lu Y., Tian Y., Shen R., Yao Q., Zhong D., Zhang X., Zhu J.K. Precise genome modification in tomato using an improved prime editing system // *Plant Biotechnol. J.* 2020. V. 19. P. 415. <https://doi.org/10.1111/pbi.13497>
 55. Tang X., Sretenovic S., Ren Q., Jia X., Li M., Fan T., Yin D., Xiang S., Guo Y., Liu L., Zheng X., Qi Y., Zhang Y. Plant prime editors enable precise gene editing in rice cells // *Mol. Plant.* 2020. V. 13. P. 667. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.03.010>
 56. Gao Y., Zhao Y. Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs in vitro and in vivo for CRISPR-mediated genome editing // *J. Integr. Plant Biol.* 2014. V. 56. P. 343. <https://doi.org/10.1111/jipb.12152>
 57. He Y., Wang R., Dai X., Zhao Y. On improving CRISPR for editing plant genes: ribozyme-mediated guide RNA production and fluorescence-based technology for isolating transgene-free mutants generated by CRISPR // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2017. V. 149. P. 151. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.03.012>
 58. Xie K., Minkenberg B., Yang Y. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015. V. 112. P. 3570. <https://doi.org/10.1073/pnas.1420294112>
 59. Hui L., Zhao M., He J., Hu Y., Huo Y., Hao H., Fu A. A simple and reliable method for creating PCR-detectable mutants in Arabidopsis with the polycistronic tRNA-gRNA CRISPR/Cas9 system // *Acta Physiol. Plant.* 2019. V. 41. P. 1. <https://doi.org/10.1007/s11738-019-2961-3>
 60. Selma S., Bernabe-Orts J.M., Vazquez-Vilar M., Diego-Martin B., Ajenjo M., Garcia-Carpintero V., Orzaez D. Strong gene activation in plants with genome-wide specificity using a new orthogonal CRISPR/Cas9-based programmable transcriptional activator // *Plant Biotechnol. J.* 2019. V. 17. P. 1703. <https://doi.org/10.1111/pbi.13138>
 61. Смирнова О.Г., Кочетов А.В. Промоторы пшеницы для экспрессии трансгенов // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2014. V. 16. С. 224.
 62. Zhang H., Zhang J., Wei P., Zhang B., Gou F., Feng Z., Zhu J.K. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation // *Plant Biotechnol. J.* 2014. V. 12. P. 797. <https://doi.org/10.1111/pbi.12200>
 63. Wang Z.P., Xing H.L., Dong L., Zhang H.Y., Han C.Y., Wang X.C., Chen Q.J. Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in Arabidopsis in a single generation // *Genome Biol.* 2015. V. 16. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0715-0>
 64. Zheng N., Li T., Dittman J.D., Su J., Li R., Gassmann W., Yang B. CRISPR/Cas9-based gene editing using egg cell-specific promoters in Arabidopsis and soybean // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11. P. 800. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00800>
 65. Mao Y., Zhang Z., Feng Z., Wei P., Zhang H., Botella J.R., Zhu J.K. Development of germ-line-specific CRISPR-Cas9 systems to improve the production of heritable gene modifications in Arabidopsis // *Plant Biotechnol. J.* 2016. V. 14. P. 519. <https://doi.org/10.1111/pbi.12468>
 66. Tsutsui H., Higashiyama T. pKAMA-ITACHI vectors for highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell Physiol.* 2017. V. 58. P. 46. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw191>
 67. Yan L., Wei S., Wu Y., Hu R., Li H., Yang W., Xie Q. High-efficiency genome editing in Arabidopsis using YAO promoter-driven CRISPR. Cas9 system // *Mol. Plant.* 2015. V. 8. P. 1820. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.10.004>
 68. Wolter F., Klemm J., Puchta H. Efficient in planta gene targeting in Arabidopsis using egg cell-specific expression of the Cas9 nuclease of *Staphylococcus aureus* // *Plant J.* 2018. V. 94. P. 735. <https://doi.org/10.1111/tpj.13893>
 69. Miki D., Zhang W., Zeng W., Feng Z., Zhu J.K. CRISPR/Cas9-mediated gene targeting in Arabidopsis using sequential transformation // *Nature Commun.* 2018. V. 17. P. 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04416-0>
 70. Rozov S.M., Permyakova N.V., Deineko E.V. The problem of the low rates of CRISPR/Cas9-mediated knock-ins in plants: approaches and solutions // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 1. <https://doi.org/10.3390/ijms20133371>
 71. Fauser F., Roth N., Pacher M., Ilg G., Sánchez-Fernández R., Biesgen C., Puchta H. In planta gene targeting // *PNAS.* 2012. V. 109. P. 7535. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202191109>
 72. Butt H., Rao G.S., Sedeek K., Aman R., Kamel R., Mahfouz M. Engineering herbicide resistance via prime editing in rice // *Plant Biotechnol. J.* 2020. V. 18. P. 2370. <https://doi.org/10.1111/pbi.13399>
 73. Butler N.M., Baltus N.J., Voytas D.F., Douches D.S. Geminivirus-mediated genome editing in potato (*Solanum tuberosum* L.) using sequence-specific nucleases //

- Front. Plant Sci. 2016. V. 7. P. 1045.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01045>
74. Shi J., Gao H., Wang H., Lafitte H.R., Archibald R.L., Yang M., Habben J.E. ARGOS 8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions // *Plant Biotechnol. J.* 2017. V. 15. P. 207.
<https://doi.org/10.1111/pbi.12603>
75. Gil-Humanes J., Wang Y., Liang Z., Shan Q., Ozuna C.V., Sánchez-León S., Baltes N.J., Starker C., Barro F., Gao C., Voytas D.F. High-efficiency gene targeting in hexaploid wheat using DNA replicons and CRISPR/Cas9 // *Plant J.* 2017. V. 89. P. 1251.
<https://doi.org/10.1111/tpj.13446>
76. Li S., Zhang Y., Xia L., Qi Y. CRISPR-Cas12a enables efficient biallelic gene targeting in rice // *Plant Biotechnol. J.* 2020. V. 18. P. 1351.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13295>
77. Weiss T., Wang C., Kang X., Zhao H., Elena Gamo M., Starker C.G., Zhang F. Optimization of multiplexed CRISPR/Cas9 system for highly efficient genome editing in *Setaria viridis* // *Plant J.* 2020. V. 104. P. 828.
<https://doi.org/10.1111/tpj.14949>
78. Butler N.M., Jansky S.H., Jiang J. First generation genome editing in potato using hairy root transformation // *Plant Biotechnol. J.* 2020. V. 18. P. 2201.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13376>
79. Zhang Q., Yin K., Liu G., Li S., Li M., Qiu J.L. Fusing T5 exonuclease with Cas9 and Cas12a increases the frequency and size of deletion at target sites // *Sci. China Life Sci.* 2020. P. 1.
<https://doi.org/10.1007/s11427-020-1671-6>
80. Piatek A., Ali Z., Baazim H., Li L., Abulfaraj A., Al-Shareef S., Mahfouz M.M. RNA-guided transcriptional regulation in planta via synthetic dCas9-based transcription factors // *Plant Biotechnol. J.* 2015. V. 13. P. 578.
<https://doi.org/10.1111/pbi.12284>
81. Xing H.L., Dong L., Wang Z.P., Zhang H.Y., Han C.Y., Liu B., Wang X.C., Chen Q.J. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants // *BMC Plant Biol.* 2014. V. 14. P. 327.
<https://doi.org/10.1186/s12870-014-0327-y>
82. Ma X., Zhang Q., Zhu Q., Liu W., Chen Y., Qiu R., Wang B., Yang Z., Li H., Lin Y., Xie Y., Shen R., Chen S., Wang Z., Chen Y., Guo J., Chen L., Zhao X., Dong Z., Liu Y.G. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants // *Mol. Plant.* 2015. V. 8. P. 1274.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.04.007>
83. Kuluev B.R., Gumerova G.R., Mikhaylova E.V., Gerashchenkov G.A., Rozhnova N.A., Vershinina Z.R., Khyazev A.V., Matniyazov R.T., Baymiev A.K., Chemeris A.V. Delivery of crispr/cas components into higher plant cells for genome editing // *Russ. J. Plant Physiol.* 2019. V. 66. P. 694.
<https://doi.org/10.1134/S102144371905011X>
84. Ordon J., Gantner J., Kemna J., Schwalgun L., Reschke M., Streubel J., Stuttmann J. Generation of chromosomal deletions in dicotyledonous plants employing a user-friendly genome editing toolkit // *Plant J.* 2017. V. 89. P. 155.
<https://doi.org/10.1111/tpj.13319>
85. Teng F., Cui T., Feng G., Guo L., Xu K., Gao Q., Li W. Repurposing CRISPR-Cas12b for mammalian genome engineering // *Cell Discov.* 2018. V. 4. P. 1.
<https://doi.org/10.1038/s41421-018-0069-3>
86. Хлесткина Е.К. Геномное редактирование риса при использовании системы CRISPR // *Биотехнология и селекция растений.* 2019. Т. 2. С. 49.
<https://doi.org/10.30901/2658-6266-2019-1-49-54>
87. Wang Y., Cheng X., Shan Q., Zhang Y., Liu J., Gao C., Qiu J.L. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew // *Nat. Biotechnol.* 2014. V. 32. P. 947.
<https://doi.org/10.1038/nbt.2969>
88. Sánchez-León S., Gil-Humanes J., Ozuna C.V., Giménez M.J., Sousa C., Voytas D.F., Barro F. Low gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9 // *Plant Biotechnol. J.* 2018. V. 16. P. 902.
<https://doi.org/10.1111/pbi.12837>
89. Zheng M., Zhang L., Tang M., Liu J., Liu H., Yang H., Hua W. Knockout of two Bna MAX 1 homologs by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis improves plant architecture and increases yield in rapeseed (*Brassica napus* L.) // *Plant Biotechnol. J.* 2020. V. 18. P. 644.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13228>

УДК 581.1

НИТРАТНЫЙ СИГНАЛИНГ В РАСТЕНИЯХ. ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ

© 2022 г. А. В. Никитин^а, *, С. Ф. Измайлов^а

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

*e-mail: nitrogenexchange@mail.ru

Поступила в редакцию 11.02.2021 г.

После доработки 15.04.2021 г.

Принята к публикации 17.04.2021 г.

В сопряжении с распознаванием (сенсинг) и транспортом рассматриваются сигнальные свойства нитрата (NO_3^-) у видов, различающихся в эволюционно-таксономическом отношении, от примитивных прокариот до цветковых растений. На основании сравнительно-физиологического анализа авторы делают предположения о некоторых путях филогенетического становления сигнальных каскадов, запускаемых указанным ионом. Возможно, нитрат возник на Земле еще в катархее при анаэробном характере первичной атмосферы. Далее появился кислородный фотосинтез, создав предпосылки для нитрификации как главного источника NO_3^- . Возрастающий градиент уровней нитрата в среде способствовал созданию полиморфизма его низко- и высокоаффинных сенсоров и транспортеров. Система сенсинга и сигналинга нитрата от прокариот была унаследована эукариотами, получив у них дальнейшее развитие. У цветковых растений налицо становление новых регуляторных механизмов, определяющих возможность тонкой настройки сенсинга и поглощения разных доз NO_3^- с участием транспортеров соответствующего сродства. В зависимости от органно-тканевой локализации данного иона расширяется спектр его сенсоров, что определяет метаболическую направленность основных функций растений, связанную с усвоением азота, фотосинтезом, ростовыми и продукционными процессами.

Ключевые слова: сенсинг нитрата, нитратный сигналинг, растения, грибы, прокариоты, биогеохимическая и молекулярная эволюция

DOI: 10.31857/S0015330322010158

ВВЕДЕНИЕ

Обзор является логическим продолжением серии наших предшествующих публикаций, посвященных создающемуся за последние десятилетия новому разделу физиологии и биохимии — нитратному сигналингу. В предшествующих обзорах [1, 2] освещались вопросы, относящиеся к возникновению исследований в этой области как следствию создания новых инструментальных возможностей в ряде смежных биологических дисциплин на рубеже XX–XXI веков. Подводились итоги результатам первых изысканий по идентификации путей сенсинга и транспорта нитрата в связи с дальнейшей каскадной природой сигналинга азотного, углеродного, вторичного обмена, а также механизмов ее реализации. В данном обзоре рассматривается процесс эволюции нитратного сигналинга как явления, начиная от его формирования с последующей модификацией и усложнением. Используемый сравнительно-физиологический подход позволяет не только

рассмотреть филогенетическое развитие механизмов регуляторного действия нитрата, но и его современный результат — полиморфизм проявлений на организменном уровне.

ПРЕДПОСЫЛКИ НИТРАТНОГО СИГНАЛИНГА В КАТАРХЕЕ

Бытует представление, что нитрат (NO_3^-) практически полностью представляет собой продукт биогенной нитрификации. Это обстоятельство, а также гипотеза об анаэробном характере первичной атмосферы, позволили предположить, что азот в добиологический катархейский эон — 4.5–4.0 млрд. лет назад (далее млрд. л. н.) был в восстановленных формах, таких как аммоний и цианид. Однако уже тогда, по-видимому, происходил электрохимический синтез нитрата с участием CO_2 как донора кислорода [3–5]. Ввиду фотолитического восстановления двухвалентным железом

вероятная концентрация нитрата при pH 6–8 и температуре 0–50°C была не более 1 мкМ [3, 5].

Однако существует и другая точка зрения. Уже в самом начале существования географической оболочки Земли было возможно и локальное обогащение среды нитратом до концентрации 10–20 мМ [3, 4]. В частности, оно могло иметь место в дождевой воде, вследствие образования при грозовых разрядах оксидов азота и их дальнейшей реакции с капельно-жидкой водой в облаках. С учетом того, что в круг продуктов первичного электросинтеза наряду с органическими веществами входил и нитрат, было весьма вероятно совместное их накопление, в силу чего указанный ион оказался своего рода маркером гидрохимической обстановки, необходимой для абиогенеза. Отсюда и следствие – возможность появления первичных реакций сенсинга нитрата уже у ранних организмов как адаптации к поиску абиогенных органических соединений.

СТАНОВЛЕНИЕ НИТРАТНОГО СИГНАЛИНГА В АРХЕЕ

Изменение окружающей среды

В архее (4.0–2.5 млрд. л. н.) началось активное преобразование среды обитания прокариотами. Не позднее 3.2 млрд. л. н. появились цианобактерии с кислородным фотосинтезом, их колонии на поверхности биогенных карбонатных построек – строматолитов стали первыми аэробными оазисами [6]. 2.7 млрд. л. н. последние распространились по всему шельфу [7]. Уже в самых древних образцах строматолитов выявлены следы активности диазотрофов, нитрификаторов и денитрификаторов, совместно реализующих замкнутый цикл азота современного типа [8–10]. Вероятно, соответствующие прокариоты находились в разных слоях бактериальных матов, различающихся по уровню кислорода и, соответственно, нитрата. Иными словами, последний был маркером аэробной микросреды. Однако, как отражено на рис. 1а, на протяжении всего архейского эона основная часть Мирового океана оставалась анаэробной, что обусловило преобладание аммонийной формы азота.

Вышеописанные особенности архейских биоценозов определили возможность дифференцированного сенсинга нитрата в низких (микромольных) и высоких (миллимолярных) концентрациях, начиная с наиболее ранних этапов биологической эволюции. Весьма вероятно, что связь определенных диапазонов уровня указанного иона с микроусловиями среды, оптимальными для конкретных групп прокариот, стала движущей силой эволюционного становления первичных каскадов нитратного сигналинга.

Сенсинг и поглощение нитрата прокариотами

Активные исследования сенсинга нитрата бактериями имели место уже в конце 1980-х гг., что было связано со сравнительной легкостью работы с указанными объектами. Так, у *Escherichia coli* были выявлены рецепторные гистидиновые протеинкиназы NarX, NtrB и NarQ [11, 12]. У других протеобактерий обнаружены Nar-белки одного типа – NarX или NarQ [13]. Показана способность названных сенсоров нитрата к автофосфорилированию в его присутствии [12].

У ряда прокариот найдены высокоаффинные сенсоры и транспортеры нитрата: NreA (константа диссоциации соответствующего комплекса K_D 22 мкМ) *Staphylococcus carnosus* Schliefer & Fischer [14] и NrtB (K_M порядка 1 мкМ) *Synechococcus* sp. PCC7942 [15], одной из наиболее примитивных цианобактерий [16], соответственно. Такие белки могли быть унаследованы от видов первичной биосферы, где указанный ион находился преимущественно в следовых количествах. Свидетельством в пользу трансцепторной природы цианобактериального NrtB является то, что у *Anabaena* sp. он ассоциирован с фактором транскрипции NtrC [17].

У прокариот выявлены и низкоаффинные транспортеры нитрата, например, NrtS (K_M 2.5 мМ) *Synechococcus elongatus* [18]. Его гомологи найдены у цианобактерий, протеобактерий и актинобактерий и, по-видимому, унаследованы от видов кислородных оазисов, став адаптивным преимуществом указанных групп в аэробной среде.

Сродство белков NrtS к нитрату у ряда видов сравнительно высокое (K_M 0.49 мМ, γ -протеобактерия *Marinomonas mediterranea*) [18], что может быть как примитивным признаком, так и поздней адаптацией к олиготрофным экотопам. У филогенетически продвинутого штамма *Synechococcus* sp. PCC 7002 [16] обнаружены два близких между собой транспортера нитрата низкого сродства – NrtS1 и NrtS2 ($K_M > 3$ мМ), гетеромерный комплекс которых имеет высокое сродство к субстрату (K_M 0.15 мМ) [18].

Трансдукция нитратного сигнала у прокариот

К концу 1980-х гг. уже было известно, что запускаемые нитратом двухкомпонентные прокариотические каскады трансдукции сигнала состоят из рецепторной гистидинкиназы и фосфорилируемого ей фактора транскрипции [11]. У *E. coli* последний представлен двумя белками – NarL и NtrC [11]. У других протеобактерий обнаружено лишь по одному модулю трансдукции нитратного сигнала – NarX-NarL или NarQ-NarP [13].

Фосфорилированный NarL индуцировал ряд белков, задействованных в “нитратном дыхании” – формиадегидрогеназу (*fdnG*), диссимиляторную

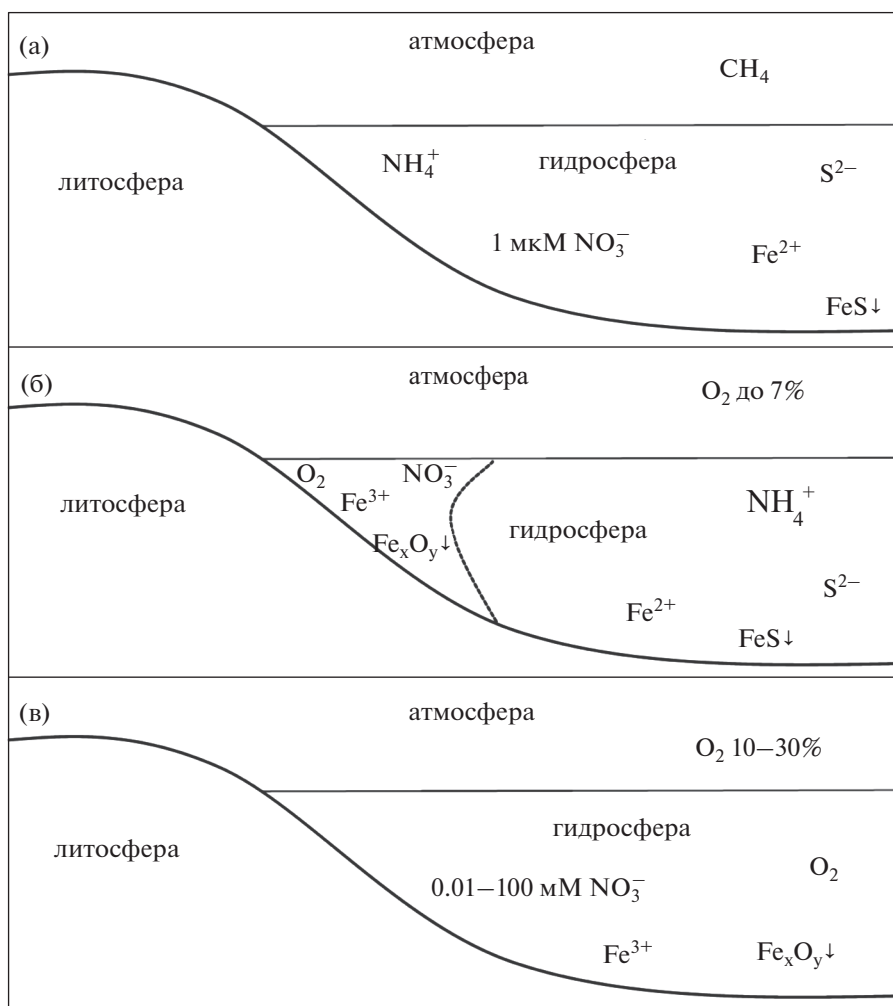


Рис. 1. Геохимия нитрата в основные эоны геологической истории: а – архей, б – протерозой, в – фанерозой. Вертикальными стрелками обозначено отложение пирита (FeS) и оксидов железа (Fe_xO_y).

нитратредуктазу (*narG*) у *E. coli* [19] и *Mycobacterium tuberculosis* [20], экспортер нитрата (*narK*), фумаратредуктазу (*frdA*) *E. coli* [21], периплазматическую нитратредуктазу (*napF*) *Haemophilus influenzae* Rd и *E. coli* [22]. У *Klebsiella pneumoniae* M5al NarL индуцировал респираторную, но не ассимиляторную нитратредуктазу [23], что подтверждает связь сигнального действия нитрата с использованием последнего как донора кислорода.

Одна из прокариотических систем совместного сигналинга нитрата и кислорода, сложившаяся как механизм выбора доступного акцептора электронов, исследована у *S. carnosus* и представляет собой комплекс Nre-белков, включающий вышеупомянутый рецептор NreA, O_2 -сенсорную протеинкиназу NreB и фактор транскрипции NreC [14]. При сочетании нитрата с аноксией у *S. carnosus* индуцируются плазмалеммная нитратредуктаза, транспортеры нитрата и нитрита, цитозольная нитритредуктаза, участвующие в “нитратном ды-

хании”. Ввиду высокой чувствительности NreA к нитрату можно предположить, что *S. carnosus* способен использовать указанный ион как окислитель уже в микромолярных концентрациях, которые имели место в архейский период.

Вышеописанные сигнальные каскады задействованы, в первую очередь, во включении “нитратного дыхания” у факультативно анаэробных прокариот. Такая особенность согласуется с предположением, что в условиях исходных архейских биогеоценозов именно нитрат как акцептор электронов мог мигрировать на сравнительно далекие расстояния, а кислород расходовался еще в пределах бактериальных матов, сформированных с участием цианобактерий.

У примитивной цианобактерии – *Synechococcus* WH5701 описан типичный для всего отдела каскад C/N-сигналинга, включающий белки P_{II}, NtcA и PipX [24]. Первый из них является цитозольным сенсором отношения АТФ/АДФ, а так-

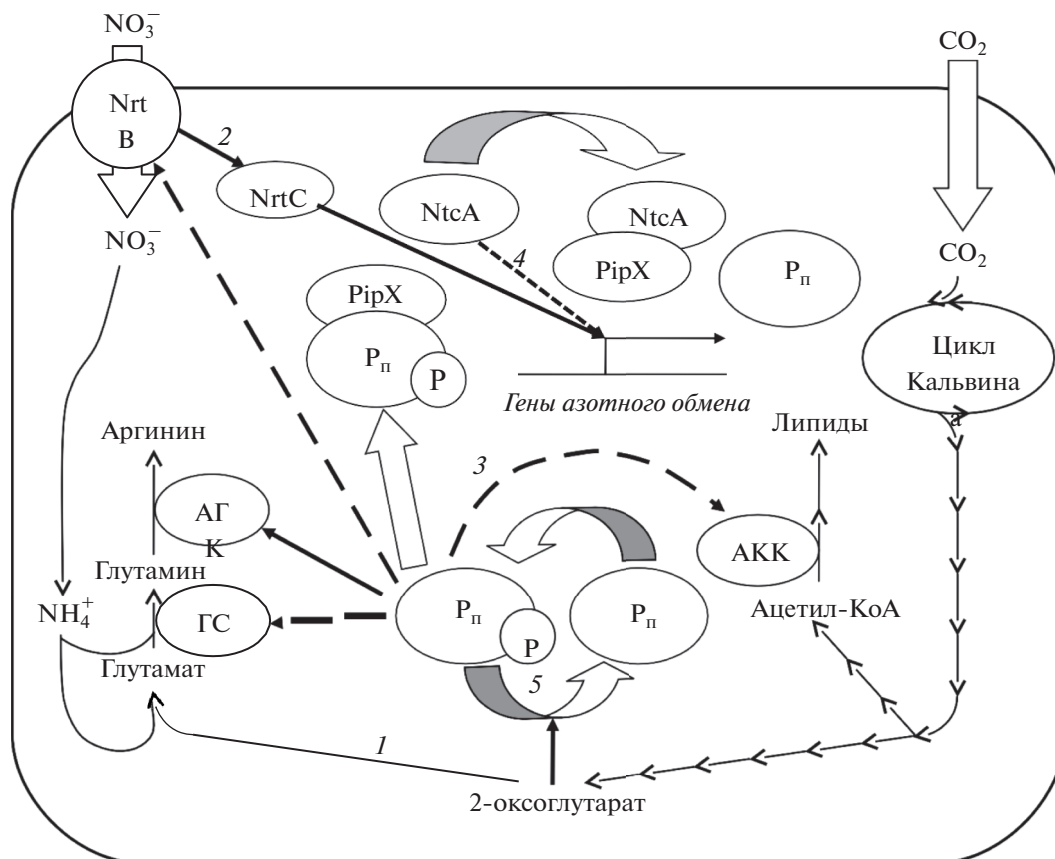


Рис. 2. Ключевые звенья C- и N-сигналинга у цианобактерий. АГК – N-ацетилглутаматкиназа, АКК – ацетил-КоА-карбоксилаза, ГС – глутаминсинтетаза. Международные обозначения: NrtB – транспортер нитрата, NrtC – белок, взаимодействующий с предыдущим, NtcA – фактор транскрипции генов азотного обмена, P – фосфат, PipX – коактиватор транскрипции генов азотного обмена. Стрелки: 1 – метаболические пути, 2 – позитивное сигнальное действие, 3 – негативное сигнальное действие, 4 – подавленное в отсутствие активного комплекса с PipX действие фактора транскрипции NtcA, 5 – переходы между возможными состояниями регуляторных молекул.

же C-акцептора аммиака – 2-оксоглутарата. При достаточном уровне энергии и углерода P_{II} дефосфорилируется, что приводит к диссоциации его комплекса с PipX. Последний активирует фактор транскрипции NtcA, который индуцирует нитрат- и нитритредуктазу [24], а у *Anabaena* PCC7120 и глутаминсинтетазу (*glnA*) [25]. В результате интенсифицируются восстановление нитрата и ассимиляция аммония. Напротив, фосфорилированный P_{II} активирует N-ацетилглутаматкиназу (ключевой фермент синтеза аргинина) и ингибирует транспортеры нитрата [26], вызывая переход от поглощения к депонированию азота. Описанная регуляторная система характерна для цианобактерий [26]. Соответствующие представления отражены на рис. 2.

У нефотосинтезирующих прокариот при дефиците 2-оксоглутарата фосфорилированный P_{II} активирует глюкозамин-6-фосфатдеаминазу, но ингибирует ацетил-КоА-карбоксилазу (ключевой фермент синтеза липидов), транспортеры нитрата и аммония, глутаминсинтетазу, а также

фактор транскрипции генов азотного обмена GlnR [26]. В результате происходит эффективное использование органических источников азота и углерода. Налицо архаичный сигнальный каскад, позволяющий клетке определить, какой из макроэлементов – углерод или азот – находится в минимуме, и переключить метаболизм на преимущественную утилизацию дефицитного ресурса. Сохранение такого рода “молекулярной машины” до наших дней свидетельствует в пользу ее эффективности в постоянно меняющейся на протяжении геологической истории окружающей среде.

Отметим, что активность белков P_{II} у *Proteobacteria* и *Actinobacteria* регулируется посредством уридинилирования и аденилирования, соответственно, а не фосфорилирования, характерного именно для *Cyanobacteria* [27].

У *E. coli* и ряда других протеобактерий [28], а также цианобактерии *Anabaena* sp. [17] мишенью P_{II} является вышеназванный рецептор нитрата NtrB. У *Rhodobacter capsulatus* появилась дополни-

тельная гистидинкиназа NtrY, способная фосфорилировать два фактора транскрипции — NtrC и NtrX [28]. У *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 выявлены независимые каскады передачи сигнала о наличии азота в среде — NtrB-NtrC и NtrY-NtrX, причем последний индуцирует рецептор нитрата NarX и соответствующий фактор транскрипции NarL [29]. Такая многоплановость регуляции становится понятной исходя из того, что *H. seropedicae* — диазотроф. Сенсинг низкого C/N-баланса с участием как NtrB, NtrY, так и P_{II}-белков приводит к репрессии генов, задействованных в азотфиксации, после чего индуцируемый в таких условиях сенсор NarX определяет адаптацию метаболизма бактерий к утилизации собственно нитрата.

По-видимому, уже у ранних прокариот наряду с нитратным сложился и сигналинг монооксида азота. При этом основным его источником является не нитрат, а аргинин — субстрат NO-синтазы [30]. Сенсинг оксида азота в клетках прокариот, по-видимому, осуществляется с участием связывающего его и кислород гемопротеида, а сигналинг — ассоциированного с последним ц-ди-ГМФ-расщепляющего фермента [31]. Аналогично, по крайней мере, у *Burkholderia pseudomallei* 1026b нитрат с участием фактора транскрипции NarL индуцировал ц-ди-ГМФ-фосфодиэстеразу (*cdpA*), тем самым снижая уровень вторичного мессенджера — ц-ди-ГМФ [32]. Конечным эффектом и нитрата, и оксида азота было подавление образования биопленок и/или их распад на отдельные клетки. Такой параллелизм может быть связан с тем, что биопленки — универсальная адаптация прокариот к азотному голоданию, связанная с их межклеточной кооперацией. Этот вопрос еще требует своего экспериментального изучения.

Как видно из вышеизложенного, в ранней эволюции прокариот, происходившей в условиях пребывания аноксии, происходила адаптация к использованию нитрата как окислителя, распространяющегося за пределы аэробных сообществ. Тем не менее, уже тогда появились приспособления к утилизации указанного иона и как основного источника азота. Среди них: высоко- и низкоаффинные сенсоры — трансцепторы нитрата, возможность регуляции их сродства к иону, способность указанных белков к автофосфорилированию, активация факторов транскрипции путем фосфорилирования последних. Соответственно, в процессе эволюции произошла специализация с дополнением C/N-сигналинга собственно нитратным.

РАЗВИТИЕ НИТРАТНОГО СИГНАЛИНГА В ПРОТЕРОЗОЕ

Изменение окружающей среды

Как отображено на рис. 16, в протерозое (2.5–0.54 млрд. л. н.) уровень свободного кислорода

в атмосфере достиг 7% [33]. Одной из причин этого было освоение цианобактериями новых экологических ниш. Так, уже в самом начале протерозоя произошел переход от пленок к матам из нитевидных колоний [16]. В период 1.6–1.0 млрд. л. н. сложились как экологическая группа планктонные цианобактерии [34]. Также произошло накопление связанного азота в среде, что отражено в увеличении концентрации указанного макроэлемента в протерозойских осадочных породах в 3.8 раз [35]. В планетарном масштабе распространился биогеохимический цикл азота современного типа, включающий нитрификацию [36].

Отметим, что 2.2 млрд. л. н. вследствие уменьшения пула атмосферного CO₂ уменьшилась электрохимическая наработка оксидов азота, что увеличило значение азотфиксации [37]. Кроме того, 0.85–0.64 млрд. л. н. повысилась биодоступность молибдена и ванадия, что обеспечило нитратредуктазу необходимыми кофакторами [38]. В результате сложились условия для биологического прогресса диазотрофов [38].

Эволюция прокариот

Изученным в молекулярно-биологическом аспекте примером эволюционно продвинутых цианобактерий, отличающихся такими инновациями, как нитчатые колонии и гетероцисты, является *Anabaena* [39]. Для нее характерна регуляция экспрессии нитрат- и нитритредуктазы не только C/N-балансом, но и самим нитратом с участием уже двух факторов транскрипции — NtcA и NtcB [17]. Вероятно, это позволяет дифференцировать реакции клетки на уровни указанного иона. У представителей рода найдены типичные для всего отдела транспортеры и сенсоры нитрата, распространенные выше — NrtB [17].

В связи с накоплением свободного кислорода в среде цианобактерии приобрели различные варианты пространственно-временного разграничения окисленного фотосинтеза и анаэробной диазотрофии [38, 39]. В частности, сформировался специальный тип азотфиксирующих клеток — гетероцисты. Их адаптивными особенностями являются: многослойная оболочка с низкой проницаемостью для кислорода, отсутствие процесса фотосинтеза и наличие интенсивного дыхания. В связи с появлением гетероцист расширилось разнообразие мишеней тех факторов транскрипции, что ранее регулировали лишь использование связанного азота. Так, белок NtcA стал индуцировать *hetR* (запуск формирования гетероцист), *nifH* (редуктаза динитрогеназы), *gor* (глутатионредуктаза) и репрессировать *rbcLS* (фотосинтез). У мутантов *ntcA* нарушалось усвоение как нитратного, так и молекулярного азота [26]. С другой стороны, у цианобактерий *Calothrix rhizosoleniae* SC01 и *Richelia intracellularis* HN01, имеющих гетероци-

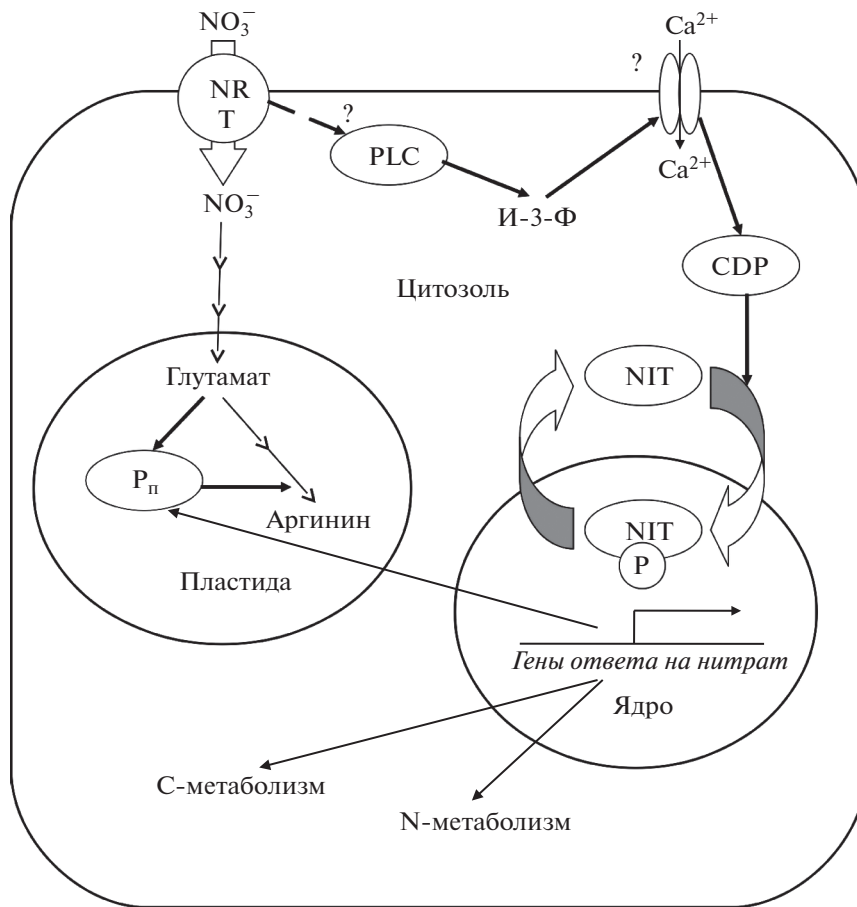


Рис. 3. Предполагаемая схема нитратного сигналинга у зеленых водорослей. CDPK – кальцийзависимые протеинкиназы, NIT – специфичный для водорослей фактор транскрипции генов, регулируемых нитратом, NRT – трансцепторы нитрата, PLC – фосфолипаза С, P – фосфат, И-3-Ф – инозиттрифосфат.

сты, нет генов, определяющих формирование альтернативных кислородных барьеров – гопаинодсодержащих мембран [40].

Судя по филогении ключевого для диазотрофии гена *nifD*, формы с гетероцистами имеют монофилетическое происхождение [41]. По-видимому, данное эволюционное приобретение стало удачным ароморфозом, за которым быстро (в геологическом масштабе) последовала адаптивная радиация группы с заполнением практически всех доступных экологических ниш.

Сенсинг и поглощение нитрата эукариотами

Как отражено на рис. 3, у эукариот системы сенсинга и сигналинга нитрата, унаследованные от прокариот, получили дальнейшее развитие. Ранние этапы такой эволюции видны на примере примитивных пикопланктонных водорослей порядка *Mamiellales* (класс *Mamiellophyceae*) [42]. Так, у *Micromonas* sp. RCC299, *Ostreococcus lucimarinus* SSE9901, *O. tauri* OTN95 обнаружено по одному низкоаффинному транспортеру нитрата из се-

мейства NRT1 [43]. У типичной зеленой водоросли – хламидомонады Рейнхардта (*Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dang.) также выявлен лишь один белок NRT1 [44]. Прослеживается родство NRT1-семейства и прокариотических пептидных транспортеров POT и PTR с сохранением механизма симпорта лиганда с протоном, а также обусловленных им консервативных особенностей структуры [45]. Некоторые из них определяют и возможность сенсинга нитрата. Можно предположить эволюционную смену узнаваемых NPF/POT/PTR лигандов от органических форм азота, типичных продуктов абиогенного синтеза, до нитрата как характерного компонента аэробного биологического круговорота. Отметим, что Nrt-белки прокариот относятся к транспортерам ABC-типа, а не NPF/POT/PTR [17], и, очевидно, стали сенсорами нитрата независимо от последних.

По последовательностям генов высокоаффинных транспортеров нитрата из семейства *NRT2* *Mamiellales* занимают промежуточное положение между другими зелеными водорослями (*Ch. reinhardtii*, *Chlorella sorokiniana* Shihira & R.W. Krauss и

Dunaliella salina (Dunal) Teodor.) и прокариотами [43]. Авторы исследования предполагают, что филогения *NRT2* отражает примитивность указанного порядка в ряду одноклеточных растений. У *Ch. reinhardtii* обнаружено четыре белка *NRT2*, узнающих нитрат, и два транспортера нитрита того же семейства [44]. Отсюда видно, что у ранних фототрофных эукариот субстратная специфика представителей семейства *NRT2* еще находилась в состоянии своего становления.

Экспрессия *NRT2* динофлагеллят *Lingulodinium polyedra* (F.Stein) J.D. Dodge не индуцировалась нитратом [46]. Вероятно, механизм такой индукции сложился у эволюционно продвинутых одноклеточных водорослей. У *Arabidopsis* в ней участвует нитратный сенсор *NRT1.1* [47]. Возможно, исходно белки *NRT1* были трансцепторами нитрата, тогда как *NRT2* только его транспортерами.

Трансдукция нитратного сигнала у эукариот

По-видимому, уже у ранних эукариот складывалось взаимодействие транспортеров *NRT2* с адапторными белками *NAR2*, необходимое для локализации их комплексов на плазмалемме, а также осуществления сенсорной и транспортной функций. У плесневого гриба *Aspergillus nidulans* (Eidam) G.Winter *NRT2* функционирует автономно [48]. У *Chlamydomonas* лишь два из шести транспортеров указанного семейства взаимодействуют с белками *NAR2* [44]. У цветковых растений, таких как *Arabidopsis*, *NAR2* необходим для работы всех известных *NRT2*-белков [49]. Налицо становление нового механизма “тонкой настройки” сенсинга и поглощения микродоз нитрата.

Сигнальные белки P_{II} были унаследованы от прокариот растениями, у которых локализованы в появившихся в ходе симбиогенеза пластидах и стали сенсорами глутамината, основного маркера N-статуса организма [50, 51]. На преемственность хлоропластов по отношению к цианобактериям указывает и общий тип посттрансляционной модификации указанных белков фосфорилированием, а не иными путями, характерными для других прокариот [28]. Также произошла специализация круга мишеней белков P_{II} . В пластидах последние регулируют наработку аргинина (что характерно и для прокариот) и поглощение цитозольного нитрита [52].

У *Ch. reinhardtii* сам нитрат (4 мМ) индуцирует P_{II} [51]. В результате создается основа для последующего C/N-сигналинга, что обратно последовательности молекулярных событий, характерной для цианобактерий. Вероятная причина — эволюционное увеличение значимости нитрата как источника азота и регулятора разнообразных физиологических процессов.

В нашем предыдущем обзоре рассмотрено участие в передаче нитратного сигнала у высших растений ионов кальция и кальцийзависимых протеинкиназ [2]. Как оказалось, такого рода звенья появились уже у весьма примитивных эукариот. Так, у *O. tauri* выявлена индукция, по крайней мере, одного из генов упомянутых протеинкиназ, *OtCDPK1*, при дефиците минерального азота в среде [53]. Аналогично у *Arabidopsis* в подобных условиях происходит активация протеинкиназ *CIPK7*, *CIPK12* и *CIPK14* с участием сенсора кальция — кальцийнейрин-В-подобного белка *CBL8* [54]. Здесь можно говорить о конвергенции, а не о гомологии.

Для большинства водорослей характерны белки с консервативным RWP-RK-доменом, например, *NIT2*, близкие к факторам транскрипции нитратиндуцибельных генов высших растений — *NLP* и, по-видимому, являющиеся их эволюционными прототипами [55]. *NLP*-белки найдены уже у *Micromonas pusilla* CCMP1545, *M. sp.* RCC299, *Ostreococcus lucimarinus* из порядка *Mamiellales* [56]. Возможно, это результат горизонтального переноса ДНК либо независимого сохранения указанных белков, унаследованных от общего предка, в линиях *Mamiellophyceae* и *Embryophyta*. В последнем случае гены *NIT* зеленых водорослей являются результатом филогенетической девиации.

С появлением и ранней эволюцией эукариот претерпел ряд изменений не только нитратный, но и NO-сигналинг. В частности, увеличилось разнообразие ферментов, участвующих в передаче сигнала. Среди них растворимые гуанилатциклазы, цГМФ-зависимые протеинкиназы и фосфоэстеразы, регулируемые циклическими нуклеотидами каналы. Однако далеко не всегда упомянутые звенья каскада передачи сигнала, даже у водорослей, присутствуют совместно с NO-синтазой [57]. Последняя характерна для животных, но среди растений присутствует даже не у всех водорослей. Вероятно, сохранение генов NO-синтазы у ряда потомков первичных фотосинтезирующих эукариот либо их горизонтальный перенос между таксономически отдаленными группами растений [58]. Среди видов, скорее всего, имеющих указанный фермент как архаичную особенность, вышеупомянутый пикопланктонный *O. tauri* [59]. Уже у *Chlamydomonas* оксид азота нарабатывают нитрат- и нитритредуктаза, причем первый фермент способен выполнять ту же функцию и у высших растений [44]. В итоге эволюционной смены источников оксида азота последний стал маркером доступности экзогенного нитрата, а не величины эндогенного N-пула, представленного аргинином. Однако и в этом случае сохранился принцип сенсинга оксида азота специальным гемопротепидом — гемоглобином.

Как видим, уже у ранних эукариот (водоросли и грибы), по существу, появились основные компоненты того каскада нитратного сигналинга, что известен на примере *Arabidopsis*. Однако разнообразие соответствующих белков невелико, что, вероятно, связано с отсутствием дифференцировки на функционально разные типы клеток.

РАЗВИТИЕ НИТРАТНОГО СИГНАЛИНГА В ФАНОРОЗОЕ

Изменение окружающей среды

В фанерозое (541 млн. л. н. и далее) содержание кислорода в атмосфере варьировало от 10% в периоды массовых вымираний до 30% — при наибольшем расцвете жизни [33]. Возросла и интенсивность нитрификации. Лишь для глобальных биосферных кризисов был характерен анаэробный Мировой океан с преобладанием аммония [60]. Кроме того, весь фанерозойский эон продолжалось накопление связанного азота в среде, что отразилось в увеличении уровня азотсодержащих веществ в осадочных породах в 1.5 раза [35]. В итоге уже на рубеже эдиакария (635–541 млн. л. н.) и кембрия (541–485 млн. л. н.) именно нитрат стал основным источником азота для растений, определяющим продуктивность морских экосистем [61, 62]. В настоящее время в составе океанского фитопланктона господствующее положение занимают нитрофильные зеленые водоросли, а не аммонифильные или диазотрофные цианобактерии [61, 63, 64]. Суммарная изложенного выше приведена на рис. 1в.

Представляет интерес то обстоятельство, что с геологической динамикой биогеохимического цикла азота связывают чередование холодных и теплых эпох, характерное для фанерозоя [65]. Так, холодные (“ледниковые”) эпохи приурочены к относительно высокому содержанию нитрата в Мировом океане, вследствие этого — депонированию углерода фитопланктоном, что уменьшало уровень одного из основных природных парниковых газов CO₂. В теплые эпохи ситуация обратная, уровень нитрата находился в минимуме и преобладало гетеротрофное высвобождение углерода в атмосферу. Отрицательные обратные связи (в первом случае уменьшение пула доступных фитопланктону макроэлементов из-за ограничения стока рек при оледенении, во втором — накопление биогенных элементов в Мировом океане вследствие интенсификации их вымывания) обеспечили колебательный характер описанных изменений.

Сенсинг и поглощение нитрата высшими растениями

В первую очередь усложнение механизмов сигналинга нитрата коснулось его трансцепторов.

У высших растений появились многочисленные NRT1-белки, различающиеся по своей локализации и функциям [44, 66]. Среди них и основной сенсор нитрата у *Arabidopsis* — NRT1.1, находящийся практически во всех органах растения, но прежде всего, в меристемах [66, 67]. Такое широкое распространение свидетельствует в пользу как физиологической значимости функций, так и древнего происхождения данного белка.

Разнообразие транспортеров нитрата низкого сродства хорошо изучено на примере *Arabidopsis*. NRT1.5 локализован в перикле, а NRT1.8 — в паренхиме ксилемы корня [66, 68]; NRT1.9 — в клетках-спутниках флоэмы корня [69]; NRT1.4 — в проводящей системе черешка листа [70]; NRT1.7, NRT1.11 и NRT1.12 — в жилках зрелых листьев [71, 72], тогда как NRT1.6 — в проводящих пучках семязачатков [73]. Такой полиморфизм связан с регуляцией не только органного распределения нитрата (данную функцию мог бы выполнять NRT1.1), но и морфогенеза вегетативных и генеративных органов. Вероятно, диверсификация семейства NRT1 происходила при становлении многоклеточной организации и выходе растений на сушу, когда в условиях гетерогенности окружающей среды начала складываться органная компартиментация пулов нитрата.

На примере *Arabidopsis* можно проследить полиморфизм транспортеров нитрата высокого сродства семейства NRT2. Так, NRT2.1 сосредоточен в ризодерме и коре корня [49], тогда как NRT2.5 — в жилках сформированных листьев [74], а NRT2.7 — на тонопласте клеток зародыша [75]. В последнем случае функционирование именно высокоаффинного транспортера позволяет обеспечить успех семенного размножения даже при азотном голодании. Соответственно, показана стимуляция экзогенным нитратом прорастания семян уже в концентрациях от 100 (*Arabidopsis*, гулявник лекарственный *Sisymbrium officinale* (L.) Scop.) до 200 мкМ (овсюг *Avena fatua* L., ячмень двурядный *Hordeum distichum* L.) [76, 77]. 1 мМ нитрат также стимулировал прорастание спор щитовника мужского *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott, систематически отдаленного от цветковых растений представителя папоротников [78]. В приведенных случаях действие указанного иона было связано с эффектом фитохрома, подавлялось хлоратом и не зависело от ингибитора нитрат-редуктазы — вольфрамата. Это позволяет сделать вывод о наличии консервативного механизма сигналинга, задействующего трансцепторы нитрата.

В ходе эволюции от одноклеточных водорослей до цветковых в транспорте и распределении нитрата стали участвовать хлоридные каналы CLC/CLV [66], а также не найденные у *Chlamydomonas* медленные анионные каналы SLAC1/SLAH и белки семейства активируемых алюминием транспорте-

ров малата ALMT [44, 79, 80]. Практически все они участвуют в адаптации растений к водному дефициту. Например, белок *Arabidopsis* SLAH3 с низким сродством к субстрату (Км 8.3 мМ) обеспечивает выход нитрата из замыкающих клеток устьиц и далее закрытие устьичной щели. Сам указанный ион в концентрациях 20–100 мМ активирует SLAH3, подавляя транспирацию [80]. Аналогичный эффект нитрата (>3 мМ) как активирующего SLAC1 антитранспиранта показан для однодольных растений – финика пальчатого *Phoenix dactylifera* L. и ячменя обыкновенного *Hordeum vulgare* L., что связано с двумя точечными мутациями в третьем трансмембранном домене указанного канала [81, 82]. Вероятно, чувствительность SLAC1 злаков и пальм к нитрату сложилась как одна из адаптаций к нараставшей в неогене (23.0–2.6 млн. л. н.) засушливости климата.

В результате совершенствования систем транспортеров нитрата увеличивалась эффективность его поглощения у видов из прогрессивных таксономических групп, тогда как примитивные растения часто оказывались адаптированными к минимальному уровню азота нитрофобами. У псилопта голого *Psilotum nudum* (L.) Beauvois уже 3.5 мкМ нитрат более чем вдвое угнетал прорастание спор, а 35 мкМ – практически полностью блокировал процесс независимо от присутствия в среде аммония [83]. Последний как единственная форма азота уже в концентрации 3.5 мкМ на 50% увеличивал рост гаметофита псилопта, а в концентрации 35 мкМ – практически в 4 раза. Аналогичные результаты были получены для гроздовника рассеченного *Botrychium dissectum* f. *obliquum* (Muhl.) Fernald [84]. Оба исследованных вида весьма примитивны в эволюционном плане и могли унаследовать экстремальную аммонифильность от ранних наземных растений. Напротив, как это было упомянуто выше, прорастание спор эволюционно продвинутого папоротника – щитовника мужского стимулируется 1 мМ нитратом, подобно прорастанию семян исследованных цветковых растений [78]. Возможно, это пример физиологической конвергенции.

Менее олиготрофный, чем псилот и гроздовник, пример растений, также предпочитающих нитрату аммоний – хвойные, более древние, чем цветковые растения. Особое место занимает такой примитивный их представитель, как араукария бразильская *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, у которой рост на 4 мМ аммония был удовлетворительным, тогда как на 4 мМ нитрате наблюдалось азотное голодание [85]. На примере сосны Массона *Pinus massoniana* Lamb. показано, что толерантность к высоким дозам аммония связана с депонированием азота в форме аспарагина [86], в котором участвует архаичный регуляторный белок P_{II} [52]. Весьма вероятно, что данная

физиологическая основа аммонифильности унаследована от древнейших эукариот.

У прогрессивных хвойных предпочтение нитрата или другого источника азота зависит от условий. Так, сосны корейская *Pinus koraiensis* Siebold & Zucc. и обыкновенная *Pinus sylvestris* L., ель корейская *Picea koraiensis* Nakai и особенно лиственница ольгинская *Larix gmelinii* var. *olgensis* (A. Henry) Ostenf. & Syrach при низкой обеспеченности азотом предпочтительно поглощали ¹⁵NO₃⁻, а не ¹⁵NH₄⁺, тогда как при высокой – наоборот [87]. В условиях теплицы сосна корейская поглощала преимущественно глицин, тогда как лиственница тонкощуйчатая *Larix kaempferi* (Lamb.) Carrière, дуб монгольский *Quercus mongolica* Fisch. ex Ledeb. и орех маньчжурский *Juglans mandshurica* Maxim. – нитрат [88]. Здесь и выше налицо примеры постепенного становления нитратофильности.

Трансдукция нитратного сигнала у высших растений

В ходе эволюционного усложнения морфогенеза высших растений на базе семейства трансцепторов нитрата низкого сродства NRT1/NPF сложился общий принцип котранспорта указанного иона и различных фитогормонов (ИУК, АБК, жасмонат, гиббереллины) [89]. На основе такого рода фактов была выдвинута гипотеза, что рецепторы эндогенных сигнальных молекул произошли от трансцепторов и их гомологов с исключительно рецепторной функцией [90]. В ходе эволюции могли последовательно происходить деспециализация NRT-белков по отношению к лигандам, включение в их число фитогормонов, появление гормон-транспортной функции и ее сопряжение с сенсингом нитрата. В результате появилась возможность регуляции указанным ионом многих морфогенетических процессов, связанных с корнепобеговой организацией.

Ярким подтверждением такого предположения является подавление 1–10 мМ нитратом экспорта ИУК из клеток корневых примордиев у *Arabidopsis*, что приводило к локальному накоплению ауксина с участием NRT1.1 [91]. Последний индуцировался указанным гормоном в области местного максимума внеклеточной концентрации нитрата [92]. Такая положительная обратная связь могла быть в основе эволюционно ранних механизмов ветвления осевых органов еще до того, как сложилась современная система транспорта и взаимодействия фитогормонов, вовлекающая в себя многообразные транспортеры, рецепторы и белки каскадов сигнальной трансдукции. Локализация NRT1.1, прежде всего, в зачатках различных частей растения [67] свидетельствует в пользу универсальности связанного с ним процесса местного сосредоточения ИУК в участках мери-

стемы с последующей дифференцировкой их по темпам роста.

Другой пример эволюционной надстройки механизмов нитратного сигналинга — появление NLP-белков, основных регуляторов транскрипции индуцируемых нитратом генов у различных видов с корнепобеговой организацией и мохообразного *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp., но не у большинства исследованных красных и зеленых водорослей [56]. Процессы появления и диверсификации NLP-белков коррелировали с усложнением органно-тканевой организации растений, став основой для широкого круга морфогенетических реакций, запускаемых нитратом. Примерами могут служить связь NLP7 белка с ростом корневой системы, а также NLP8 — с прорастанием семян *Arabidopsis* [93, 94]. Различиям в структуре указанных факторов транскрипции соответствуют специфические наборы генов-мишеней. Показано, что белок NLP7 индуцировал ген другого регулятора транскрипции — *ANRI*, локализованного в апексах боковых корней и поддерживающего их рост в обогащенной нитратом почве, а также ген рецептора ИУК, *AFB3*, участвующий в гормональной регуляции ризогенеза [93]. Мишенью NLP8 был ген АБК-8'-гидроксилазы *CYP707A*, которая катализировала первую реакцию деградации АБК и тем самым выводила семяна из состояния покоя [94]. Круг знаний о молекулярных механизмах такого рода дифференцированных нитратзависимых процессов роста морфогенеза продолжает расширяться. Становится понятным, что важное значение в эволюции белков семейства NLP имело изменение распознаваемых регуляторных последовательностей ДНК. Напротив, сам принцип передачи сигнала с трансцепторов, узнающих различные лиганды, на протеинкиназы, фосфорилирующие консервативные факторы транскрипции, которые затем мигрируют в ядро, где взаимодействуют с генами-мишенями, типичен для современных эукариот и, вероятно, унаследован ими от общего предка [95].

Нами показано на примере гороха посевного *Pisum sativum* L., что среди мишеней позитивного сигнального действия нитрата у высших растений находится и стартовый фермент углеводного метаболизма — сахарозсинтаза, обеспечивающая субстратом наработку структурных полисахаридов и ряд других биосинтезов [96, 97]. Учитывая, что указанный белок выявлен даже у цианобактерий [98], можно предполагать широкое распространение и его регуляции нитратом у широкого круга растений как способа стимуляции роста гетеротрофных органов. Среди них: семязачаток, зародышевая ось, корень, гипокотиль, а также практически все меристемы разнотипной локализации. В упомянутых примерах возможны различия в соотношении интенсивностей конститутивной (например, с участием цитозольной инвертазы) и

нитратзависимой утилизации сахарозы, что, в конечном счете, на донорно-акцепторном уровне определяет варианты перестройки архитектоники растения в зависимости от обеспеченности нитратом. Вклад позитивного нитратного сигналинга сахарозсинтазы в конкретные морфогенетические процессы — актуальная проблема, по существу, остающаяся неразработанной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прогрессивная направленность эволюции систем сенсинга и передачи сигнала нитрата в целом выражается в появлении организмов со все более высокой приспособляемостью к широкому диапазону концентраций указанного иона в окружающей среде. От первых прокариот к разнообразным современным растениям постепенно сложились дифференцированные механизмы сенсинга и передачи сигналов нитрата, участвующие в результирующих физиологических реакциях. При этом реализовались различные типы эволюционных изменений (параллелизм, дивергенция, а также дифференциация семейств белков от одного предшественника). В ближайшей перспективе предстоит развитие исследований по изучению органно-тканевой и внутриклеточной специфики сигнальных каскадов, запускаемых нитратом, и их взаимодействию с другими агентами (свет, фитогормоны, углеводы и др.). С учетом важности популяции как единицы эволюционного процесса важно выявить внутри- и межвидовую специфику трансцепторов нитрата и связанных с ними путей передачи сигналов, вплоть до полиморфизма генов-мишеней у представителей разных экологических ниш с целью повышения продуктивности культурных растений и сохранения биоразнообразия природных комплексов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит описания каких-либо экспериментов с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 121033000137-1).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Izmailov S.F., Nikitin A.V., Rodionov V.A.* Nitrate signaling in plants: Introduction to the problem // *Russ. J. Plant Physiol.* 2018. V. 65. P. 477. <https://doi.org/10.1134/S1021443718040027>
2. *Izmailov S.F., Nikitin A.V.* Nitrate signaling in plants: Mechanisms of implementation // *Russ. J. Plant Physiol.* 2020. V. 67. P. 31. <https://doi.org/10.1134/S1021443720010082>
3. *Wong M.L., Charnay B.D., Gao P., Yung Y.L., Russell M.J.* Nitrogen oxides in early Earth's atmosphere as electron

- acceptors for life's emergence // *Astrobiol.* 2017. V. 17. P. 975.
<https://doi.org/10.1089/ast.2016.1473>
4. *Laneville M., Kameya M., Cleaves H.J.* Earth without life: A systems model of a global abiotic nitrogen cycle // *Astrobiol.* 2018. V. 18. P. 897.
<https://doi.org/10.1089/ast.2017.1700>
 5. *Ranjan S., Todd Z.R., Rimmer P.B., Sasselov D.D., Babbin A.R.* Nitrogen oxide concentrations in natural waters on early Earth // *Geochem. Geophys. Geosyst.* 2019. V. 20. P. 2021.
<https://doi.org/10.1029/2018GC008082>
 6. *Eickmann B., Hofmann A., Wille M., Thi H.B., Boswell A.W., Schoenberg R.* Isotopic evidence for oxygenated Mesoarchaean shallow oceans // *Nature Geosci.* 2018. V. 11. P. 133.
<https://doi.org/10.1038/s41561-017-0036-x>
 7. *Yang J., Junium C.K., Grassineau N.V., Nisbet E.G., Izon G., Mettam C., Martin A., Zerkle A.L.* Ammonium availability in the Late Archaean nitrogen cycle // *Nature Geosci.* 2019. V. 12. P. 553.
<https://doi.org/10.1038/s41561-019-0371-1>
 8. *Ruvindy R., White III R.A., Neilan B.A., Burns B.P.* Unravelling core microbial metabolisms in the hypersaline microbial mats of Shark Bay using high-throughput metagenomics // *ISME J.* 2016. P. 183.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2015.87>
 9. *Molina V., Dorador C., Fernández C., Bristow L., Eissler Y., Hengst M., Hernandez K., Olsen L.M., Harrod C., Marchant F., Anguita C., Cornejo M.* The activity of nitrifying microorganisms in a high-altitude Andean wetland // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2018. V. 94. Art. fiy062. P. 1.
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiy062>
 10. *Mettam C., Zerkle A.L., Claire M.W., Prave A.R., Poulton S.W., Junium C.K.* Anaerobic nitrogen cycling on a Neoproterozoic ocean margin // *Earth Planet. Sci. Lett.* 2019. 527. Art. 115800.
<https://doi.org/10.1016/j.epsl.2019.115800>
 11. *Nohn T., Noji S., Taniguchi S., Saito T.* The *narX* and *narL* genes encoding the nitrate-sensing regulators of *Escherichia coli* are homologous to a family of prokaryotic two-component regulatory genes // *Nucl. Acid Res.* 1989. V. 17. P. 2947.
<https://doi.org/10.1093/nar/17.8.2947>
 12. *Cavicchioli R., Schröder I., Constanti M., Gunsalus R.P.* The NarX and NarQ sensor-transmitter proteins of *Escherichia coli* each require two conserved histidines for nitrate-dependent signal transduction to NarL // *J. Bacteriol.* 1995. V. 177. P. 2416.
<https://doi.org/10.1128/jb.177.9.2416-2424.1995>
 13. *Stewart V.* Nitrate- and nitrite-responsive sensors NarX and NarQ of proteobacteria // *Biochem. Soc. Trans.* 2003. V. 31 (Pt 1). P. 1.
<https://doi.org/10.1042/bst0310001>
 14. *Niemann V., Koch-Singenstreu M., Neu A., Nilkens S., Götz F., Uden G., Stehle T.* The NreA protein functions as a nitrate receptor in the staphylococcal nitrate regulation system // *J. Mol. Biol.* 2014. V. 426. P. 1539.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.12.026>
 15. *Omata T., Andriess X., Hirano A.* Identification and characterization of a gene cluster involved in nitrate transport in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942 // *Mol. Gen. Genet.* 1993. V. 236. P. 193.
<https://doi.org/10.1007/BF00277112>
 16. *Uyeda J.C., Harmon L.J., Blank C.E.* A comprehensive study of cyanobacterial morphological and ecological evolutionary dynamics through deep geologic time // *PLoS ONE.* 2016. V. 11. Art. e0162539. P. 1.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162539>
 17. *Herrero A., Flores E.* Genetic responses to carbon and nitrogen availability in *Anabaena* // *Environ Microbiol.* 2019. V. 21. P. 1.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.14370>
 18. *Maeda S.-I., Aoba R., Nishino Y., Omata T.* A novel bacterial nitrate transporter composed of small transmembrane proteins // *Plant Cell Physiol.* 2019. V. 60. P. 2180.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcz112>
 19. *Darwin A.J., Li J., Stewart V.* Analysis of nitrate regulatory protein NarL-binding sites in the *fdnG* and *narG* operon control regions of *Escherichia coli* K-12 // *Mol. Microbiol.* 1996. V. 20. P. 621.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.5491074.x>
 20. *Shivakumar K.V., Karunakar P., Chatterjee J.* Inhibition of NarL of *Mycobacterium tuberculosis*: an *in silico* approach // *Interdiscip. Sci.* 2014. V. 6. P. 292.
<https://doi.org/10.1007/s12539-014-0179-z>
 21. *Li J., Kustu S., Stewart V.* *In vitro* interaction of nitrate-responsive regulatory protein NarL with DNA target sequences in the *fdnG*, *narG*, *narK* and *frdA* operon control regions of *Escherichia coli* K-12 // *J. Mol. Biol.* 1994. V. 241. P. 150.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1485>
 22. *Stewart V., Bledsoe P.J.* Fnr-, NarP- and NarL-dependent regulation of transcription initiation from the *Haemophilus influenzae* Rd *napF* (periplasmic nitrate reductase) promoter in *Escherichia coli* K-12 // *J. Bacteriol.* 2005. V. 187. P. 6928.
<https://doi.org/10.1128/JB.187.20.6928-6935.2005>
 23. *Stewart V., Cali B.M.* Genetic evidence that NarL function is not required for nitrate regulation of nitrate assimilation in *Klebsiella pneumoniae* M5al // *J. Bacteriol.* 1990. V. 172. P. 4482.
<https://doi.org/10.1128/jb.172.8.4482-4488.1990>
 24. *Laichoubi K.B., Beez S., Espinosa J., Forchhammer K., Contreras A.* The nitrogen interaction network in *Synechococcus* WH5701, a cyanobacterium with two PipX and two P(II)-like proteins // *Microbiol.* 2011. V. 157. Pt. 4. P. 1220.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.047266-0>
 25. *Golden J.W., Yoon H.S.* Heterocyst formation in *Anabaena* // *Curr. Opin. Microbiol.* 1998. V. 1. P. 623.
[https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(98\)80106-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(98)80106-9)
 26. *Forchhammer K., Selim K.A.* Carbon/nitrogen homeostasis control in cyanobacteria // *FEMS Microbiol. Rev.* 2019. pii: fuz025. P. 1.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuz025>
 27. *Merrick M.* Post-translational modification of P_{II} signal transduction proteins // *Front. Microbiol.* 2015. V. 5. Art. 763. P. 1.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00763>
 28. *Drepper T., Wiethaus J., Giaourakis D., Gross S., Schubert B., Vogt M., Wiencek Y., McEwan A.G., Mase-*

- pohl B.* Cross-talk towards the response regulator NtrC controlling nitrogen metabolism in *Rhodobacter capsulatus* // FEMS Microbiol. Lett. 2006. V. 258. P. 250. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00228.x>
29. *Bonato P., Alves L.R., Osaki J.H., Rigo L.U., Pedrosa F.O., Souza E.M., Zhang N., Schumacher J., Buck M., Wassem R., Chubatsu L.S.* The NtrY-NtrX two-component system is involved in controlling nitrate assimilation in *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 // FEBS J. 2016. V. 283. P. 3919. <https://doi.org/10.1111/febs.13897>
 30. *Rafferty S.* Nitric oxide synthases of bacteria-and other unicellular organisms // Open Nitric Oxide J. 2011. V. 3. P. 25. <https://doi.org/10.2174/1875042701103010025>
 31. *Arora D.P., Hossain S., Xu Y., Boon E.M.* Nitric oxide regulation of bacterial biofilms // Biochem. 2015. V. 54. P. 3717. <https://doi.org/10.1021/bi501476n>
 32. *Mangalea M.R., Plumley B.A., Borlee B.R.* Nitrate sensing and metabolism inhibit biofilm formation in the opportunistic pathogen *Burkholderia pseudomallei* by reducing the intracellular concentration of c-di-GMP // Front. Microbiol. 2017. V. 8. Art. 1353. P. 1. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01353>
 33. *Large R.R., Mukherjee I., Gregory D., Steadman J., Corkrey R., Danyushевsky L.V.* Atmosphere oxygen cycling through the Proterozoic and Phanerozoic // Mineral. Deposita. 2019. V. 54. P. 485. <https://doi.org/10.1007/s00126-019-00873-9>
 34. *Sánchez-Baracaldo P.* Origin of marine planktonic cyanobacteria // Sci. Rep. 2015. V. 5. Art. 17418. P. 1. <https://doi.org/10.1038/srep17418>
 35. *Johnson B.W., Goldblatt C.* A secular increase in continental crust nitrogen during the Precambrian // Geochem. Persp. Lett. 2017. V. 4. P. 24. <https://doi.org/10.7185/geochemlet.1731>
 36. *Garvin J., Buick R., Anbar A.D., Arnold G.L., Kaufman A.J.* Isotopic evidence for an aerobic nitrogen cycle in the latest Archean // Sci. 2009. V. 323. P. 1045. <https://doi.org/10.1126/science.1165675>
 37. *Navarro-González R., McKay C.P., Mvondo D.N.* A possible nitrogen crisis for Archean life due to reduced nitrogen fixation by lightning // Nature. 2001. V. 412. P. 61. <https://doi.org/10.1038/35083537>
 38. *Sánchez-Baracaldo P., Ridgwell A., Raven J.A.* A neoproterozoic transition in the marine nitrogen cycle // Curr. Biol. 2014. V. 24. P. 652. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.01.041>
 39. *Uyeda J.C., Harmon L.J., Blank C.E.* A comprehensive study of cyanobacterial morphological and ecological evolutionary dynamics through deep geologic time // PLoS ONE. 2016. V. 11. Art. e0162539. P. 1. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162539>
 40. *Cornejo-Castillo F.M., Zehr J.P.* Hopanoid lipids may facilitate aerobic nitrogen fixation in the ocean // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2019. V. 116. P. 18269. <https://doi.org/10.1073/pnas.1908165116>
 41. *Esteves-Ferreira A.A., Cavalcanti J.H.F., Vaz M.G.M.V., Alvarenga L.V., Nunes-Nesi A., Araújo W.L.* Cyanobacterial nitrogenases: phylogenetic diversity, regulation and functional predictions // Genet. Mol. Biol. 2017. V. 40. P. 261. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0050>
 42. *Marin B., Melkonian M.* Molecular phylogeny and classification of the *Mamiellophyceae* class. nov. (*Chlorophyta*) based on sequence comparisons of the nuclear- and plastid-encoded rRNA operons // Protist. 2010. V. 161. P. 304. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2009.10.002>
 43. *McDonald S.M., Plant J.N., Worden A.Z.* The mixed lineage nature of nitrogen transport and assimilation in marine eukaryotic phytoplankton: a case study of *Micromonas* // Mol. Biol. Evol. 2010. V. 27. P. 2268. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq113>
 44. *Calatrava V., Chamizo-Ampudia A., Sanz-Luque E., Oc-aña-Calahorra F., Llamas A., Fernandez E., Galvan A.* How *Chlamydomonas* handles nitrate and the nitric oxide cycle // J. Exp. Bot. 2017. V. 68. P. 2593. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw507>
 45. *Longo A., Miles N.W., Dickstein R.* Genome mining of plant NPFs reveals varying conservation of signature motifs associated with the mechanism of transport // Front. Plant Sci. 2018. V. 4. Art. 1668. P. 1. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01668>
 46. *Bellefeuille S.D., Morse D.* The main nitrate transporter of the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* is constitutively expressed and not responsible for daily variations in nitrate uptake rates // Harmful Algae. 2016. V. 55. P. 272. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.03.021>
 47. *Ho C.H., Lin S.H., Hu H.C., Tsay Y.F.* CHL1 functions as a nitrate sensor in plants // Cell. 2009. V. 138. P. 1184. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.004>
 48. *Kotur Z., Unkles S.E., Glass A.D.M.* Comparisons of the *Arabidopsis thaliana* High-affinity Nitrate Transporter Complex AtNRT2.1/AtNAR2.1 and the *Aspergillus nidulans* AnNRTA: structure function considerations // Israel J. Plant Sci. 2017. V. 64. P. 21. <https://doi.org/10.1080/07929978.2016.1246147>
 49. *Orsel M., Chopin F., Leleu O., Smith S.J., Krapp A., Daniel-Vedele F., Miller A.J.* Nitrate signaling and the two component high affinity uptake system in *Arabidopsis* // Plant Signal Behav. 2007. V. 2. P. 260. <https://doi.org/10.4161/psb.2.4.3870>
 50. *Lapina T., Selim K.A., Forchhammer K., Ermilova E.* The PII signaling protein from red algae represents an evolutionary link between cyanobacterial and Chloroplastida PII proteins // Sci. Rep. 2018. V. 8. Art. 790. P. 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-19046-7>
 51. *Zalutskaya Z., Kochemasova L., Ermilova E.* Dual positive and negative control of *Chlamydomonas* PII signal transduction protein expression by nitrate/nitrite and NO via the components of nitric oxide cycle // BMC Plant Biol. 2018. V. 18. Art. 305. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1540-x>
 52. *Uhrig R.G., Ng K.K., Moorhead G.B.* PII in higher plants: a modern role for an ancient protein // Trends Plant Sci. 2009. V. 14. P. 505. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.07.003>
 53. *Caló G., Scheidegger D., Martínez-Noël G.M.A., Salerno G.L.* Ancient signal for nitrogen status sensing in the green lineage: Functional evidence of CDPK repertoire in *Ostreococcus tauri* // Plant Physiol. Bio-

- chem. 2017 V. 118. P. 377.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.07.009>
54. Yasuda S., Aoyama S., Hasegawa Y., Sato T., Yamaguchi J. Arabidopsis CBL-interacting protein kinases regulate carbon/nitrogen-nutrient response by phosphorylating ubiquitin ligase ATL31 // *Mol. Plant*. 2017. V. 10. P. 605.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.01.005>
 55. Chardin C., Girin T., Roudier F., Meyer C., Krapp A. The plant RWP-RK transcription factors: key regulators of nitrogen responses and of gametophyte development // *J. Exp. Bot*. 2014. V. 65. P. 5577.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eru261>
 56. Mu X., Luo J. Evolutionary analyses of NIN-like proteins in plants and their roles in nitrate signaling // *Cell. Mol. Life Sci*. 2019. V. 76. P. 3753.
<https://doi.org/10.1007/s00018-019-03164-8>
 57. Astier J., Mounier A., Santolini J., Jeandroz S., Wendehenne D. The evolution of nitric oxide signalling diverges between animal and green lineages // *J. Exp. Bot*. 2019. V. 70. P. 4355.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erz088>
 58. Jeandroz S., Wipf D., Stuehr D.J., Lamattina L., Melkonian M., Tian Z., Zhu Y., Carpenter E.J., Wong G.K., Wendehenne D. Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom // *Sci. Signal*. 2016. V. 9. Art. re2.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.aad4403>
 59. Weisslocker-Schaetzel M., André F., Touazi N., Foresi N., Lembrouk M., Dorlet P., Frelet-Barrand A., Lamattina L., Santolini J. The NOS-like protein from the microalgae *Ostreococcus tauri* is a genuine and ultrafast NO-producing enzyme // *Plant Sci*. 2017. V. 265. P. 100.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.09.019>
 60. Sun Y.D., Zulla M.J., Joachimski M.M., Bond D.P.G., Wignall P.B., Zhang Z.T., Zhang M.H. Ammonium ocean following the end-Permian mass extinction // *Earth Planet. Sci. Lett*. 2019. V. 518. P. 211.
<https://doi.org/10.1016/j.epsl.2019.04.036>
 61. Xiang L., Schoepfer S.D., Zhang H., Cao C.-Q., Shen S.-Z. Evolution of primary producers and productivity across the Ediacaran-Cambrian transition // *Precamb. Res*. 2018. V. 313. P. 68.
<https://doi.org/10.1016/j.precamres.2018.05.023>
 62. Chen Y., Diamond C.W., Stüeken E.E., Cai C., Gill B.C., Zhang F., Bates S., Chu X., Ding Y., Lyons T.W. Coupled evolution of nitrogen cycling and redoxcline dynamics on the Yangtze Block across the Ediacaran-Cambrian transition // *Geochim. Cosmochim. Acta*. 2019. V. 257. P. 243.
<https://doi.org/10.1016/j.gca.2019.05.017>
 63. Stüeken E.E., Kipp M.A., Koehler M.C., Buick R. The evolution of Earth's biogeochemical nitrogen cycle // *Earth-Sci. Rev*. 2016. V. 160. P. 220.
<https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2016.07.007>
 64. Van Oostende N., Fawcett S.E., Marconi D., Lueders-Dumont J., Sabadel A.J.M., Woodward E.M.S., Jönsson B.F., Sigman D.M., Ward B.B. Variation of summer phytoplankton community composition and its relationship to nitrate and regenerated nitrogen assimilation across the North Atlantic Ocean // *Deep Sea Res. Part I: Oceanogr. Res. Pap*. 2017. V. 121. P. 79.
<https://doi.org/10.1016/j.dsr.2016.12.012>
 65. Kvale K.F., Turner K.E., Landolfi A., Meissner K.J. Phytoplankton calcifiers control nitrate cycling and the pace of transition in warming icehouse and cooling greenhouse climates // *Biogeosci*. 2019. V. 16. P. 1019.
<https://doi.org/10.5194/bg-16-1019-2019>
 66. Wang Y.-Y., Hsu P.-K., Tsay Y.-F. Uptake, allocation and signaling of nitrate // *Trends Plant Sci*. 2012. V. 17. P. 458.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.006>
 67. Guo F.-Q., Wang R., Chen M., Crawford N.M. The *Arabidopsis* dual-affinity nitrate transporter gene *AtNRT1.1 (CHLI)* is activated and functions in nascent organ development during vegetative and reproductive growth // *Plant Cell*. 2001. V. 13. P. 1761.
<https://doi.org/10.1105/TPC.010126>
 68. Zhang G.-B., Yi H.-Y., Gong J.-M. The *Arabidopsis* ethylene/jasmonic acid-NRT signaling module coordinates nitrate reallocation and the trade-off between growth and environmental adaptation // *Plant Cell*. 2014. V. 26. P. 3984.
<https://doi.org/10.1105/tpc.114.129296>
 69. Wang Y.-Y., Tsay Y.-F. *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.9 is important in phloem nitrate transport // *Plant Cell*. 2011. V. 23. P. 1945.
<https://doi.org/10.1105/tpc.111.083618>
 70. Chiu Ch.-Ch., Lin Ch.-S., Hsia A.-P., Su R.-Ch., Lin H.-L., Tsay Y.-F. Mutation of a nitrate transporter, *AtNRT1.4*, results in a reduced petiole nitrate content and altered leaf development // *Plant Cell Physiol*. 2004. V. 45. P. 1139.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pch143>
 71. Fan Sh.-Ch., Lin Ch.-S., Hsu P.-K., Lin Sh.-H., Tsay Y.-F. The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.7, expressed in phloem, is responsible for source-to-sink remobilization of nitrate // *Plant Cell*. 2009. V. 21. P. 2750.
<https://doi.org/10.1105/tpc.109.067603>
 72. Hsu P.-K., Tsay Y.-F. Two phloem nitrate transporters, NRT1.11 and NRT1.12, are important for redistributing xylem-borne nitrate to enhance plant growth // *Plant Physiol*. 2013. V. 163. P. 844.
<https://doi.org/10.1104/pp.113.226563>
 73. Almagro A., Lin S.H., Tsay Y.F. Characterization of the *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.6 reveals a role of nitrate in early embryo development // *Plant Cell*. 2008. V. 20. P. 3289.
<https://doi.org/10.1105/tpc.107.056788>
 74. Lezhneva L., Kiba T., Feria-Bourrellier A.-B., Lafouge F., Boutet-Mercey S., Zoufan P., Sakakibara H., Daniel-Vedele F., Krapp A. The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT2.5 plays a role in nitrate acquisition and remobilization in nitrogen-starved plants // *Plant J*. 2014. V. 80. P. 230.
<https://doi.org/10.1111/tpj.12626>
 75. Chopin F., Orsel M., Dorbe M.F., Chardon F., Truong H.N., Miller A.J., Krapp A., Daniel-Vedele F. The *Arabidopsis* ATNRT2.7 nitrate transporter controls nitrate content in seeds // *Plant Cell*. 2007. V. 19. P. 1590.
<https://doi.org/10.1105/tpc.107.050542>
 76. Luna B., Moreno J.M. Light and nitrate effects on seed germination of Mediterranean plant species of several functional groups // *Plant Ecol*. 2009. V. 203. P. 123.
<https://doi.org/10.1007/s11258-008-9517-8>

77. *Duermeyer L., Khodapanahi E., Yan D., Krapp A., Rothstein S.J., Nambara E.* Regulation of seed dormancy and germination by nitrate // *Seed Sci. Res.* 2018. V. 28. P. 150.
<https://doi.org/10.1017/S096025851800020X>
78. *Haas C.J., Scheuerlein R.* Nitrate effect on phytochrome-mediated germination in fern spores: Investigations on the mechanism of nitrate action // *J. Plant Physiol.* 1991. V. 138. P. 350.
[https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)80299-3](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80299-3)
79. *Sasaki T., Mori I.C., Furuichi T., Munemasa Sh., Toyooka K., Matsuoka K., Murata Y., Yamamoto Y.* Closing plant stomata requires a homolog of an aluminum-activated malate transporter // *Plant Cell Physiol.* 2010. V. 51. P. 354.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcq016>
80. *Geiger D., Maierhofer T., Al-Rasheid Kh.A.S., Scherzer S., Mumm P., Liese A., Ache P., Wellmann Ch., Marten I., Grill E., Romeis T., Hedrich R.* Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1 // *Sci. Signal.* 2011. V. 4. Art. ra32. P. 1.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.2001346>
81. *Müller H.M., Schäfer N., Bauer H., Geiger D., Lautner S., Fromm J., Riederer M., Bueno A., Nussbaumer T., Mayer K., Alquraishi S.A., Alfarhan A.H., Neher E., Al-Rasheid K.A.S., Ache P., Hedrich R.* The desert plant *Phoenix dactylifera* closes stomata via nitrate-regulated SLAC1 anion channel // *New Phytol.* 2017. V. 216. P. 150.
<https://doi.org/10.1111/nph.14672>
82. *Schäfer N., Maierhofer T., Herrmann J., Jørgensen M.E., Lind C., von Meyer K., Lautner S., Fromm J., Felder M., Hetherington A.M., Ache P., Geiger D., Hedrich R.* A tandem amino acid residue motif in guard cell SLAC1 anion channel of grasses allows for the control of stomatal aperture by nitrate // *Curr. Biol.* 2018. V. 28. P. 1370.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.03.027>
83. *Whittier D.P.* Effects of nitrogen source on spore germination and gametophyte growth in *Ptilotum* // *Bot. Gaz.* 1990. V. 151. P. 50.
<https://doi.org/10.1086/337804>
84. *Melan M.A., Whittier D.P.* Effects of inorganic nitrogen sources on spore germination and gametophyte growth in *Botrychium dissectum* // *Plant Cell Environ.* 1990. V. 13. P. 477.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1990.tb01325.x>
85. *Garbin M.L., Dillenburg L.R.* Effects of different nitrogen sources on growth, chlorophyll concentration, nitrate reductase activity and carbon and nitrogen distribution in *Araucaria angustifolia* // *Braz. J. Plant Physiol.* 2008. V. 20. P. 295.
<https://doi.org/10.1590/S1677-04202008000400005>
86. *Ren Q., Zhou Y., Zhou X.* Combined transcriptome and proteome analysis of masson pine (*Pinus massoniana* Lamb.) seedling root in response to nitrate and ammonium supplementations // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21(20). P. 7548.
<https://doi.org/10.3390/ijms21207548>
87. *Zhou X., Wang A., Hobbie E.A., Zhu F., Qu Y., Dai L., Li D., Liu X., Zhu W., Koba K., Li Y., Fang Y.* Mature conifers assimilate nitrate as efficiently as ammonium from soils in four forest plantations // *New Phytol.* 2020. V. 229. P. 3184.
<https://doi.org/10.1111/nph.17110>
88. *Zhu F., Dai L., Hobbie E.A., Koba K., Liu X., Gurmessa G.A., Huang S., Li S., Li Y., Han S., Fang Y.* Uptake patterns of glycine, ammonium, and nitrate differ among four common tree species of northeast China // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. Art. 799.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00799>
89. *Corratgé-Faillie C., Lacombe B.* Substrate (un)specificity of *Arabidopsis* NRT1/PTR FAMILY (NPF) proteins // *J. Exp. Bot.* 2017. V. 68. P. 3107.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erw499>
90. *Thevelein J.M., Voordeckers K.* Functioning and evolutionary significance of nutrient transceptors // *Mol. Biol. Evol.* 2009. V. 26. P. 2407.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msp168>
91. *Krouk G., Lacombe B., Bielach A., Perrine-Walker F., Malinska K., Mounier E., Hoyerova K., Tillard P., Leon S., Ljung K., Zazimalova E., Benkova E., Nacry P., Gojon A.* Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants // *Dev Cell.* 2010. V. 18. P. 927.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.05.008>
92. *Guo F.Q., Wang R., Crawford N.M.* The *Arabidopsis* dual-affinity nitrate transporter gene *AtNRT1.1 (CHLI)* is regulated by auxin in both shoots and roots // *J. Exp. Bot.* 2002. V. 53. P. 835.
<https://doi.org/10.1093/jexbot/53.370.835>
93. *Yu L.-H., Wu J., Tang H., Yuan Y., Wang S.-M., Wang Y.-P., Zhu Q.-S., Li S.-G., Xiang C.-B.* Overexpression of *Arabidopsis NLP7* improves plant growth under both nitrogen-limiting and -sufficient conditions by enhancing nitrogen and carbon assimilation // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. Art. 27795.
<https://doi.org/10.1038/srep27795>
94. *Yan D., Easwaran V., Chau V., Okamoto M., Ierullo M., Kimura M., Endo A., Yano R., Pasha A., Gong Y., Bi Y.-M., Provart N., Guttman D., Krapp A., Rothstein S.J., Nambara E.* NIN-like protein 8 is a master regulator of nitrate-promoted seed germination in *Arabidopsis* // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. Art. 13179.
<https://doi.org/10.1038/ncomms13179>
95. *Konishi M., Yanagisawa S.* *Arabidopsis* NIN-like transcription factors have a central role in nitrate signalling // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. Art. 1617.
<https://doi.org/10.1038/ncomms2621>
96. *Bruskova R.K., Nikitin A.V., Satskaya M.V., Izmailov S.F.* Effect of nitrate on pea sucrose synthase // *Russ. J. Plant Physiol.* 2009. V. 56. P. 74.
<https://doi.org/10.1134/S1021443709010117>
97. *Nikitin A.V., Izmailov S.F.* Enzymes of sucrose dissimilation as targets for nitrate in early ontogenesis of garden pea // *Russ. J. Plant Physiol.* 2016. V. 63. P. 152.
<https://doi.org/10.1134/S1021443715060138>
98. *Curatti L., Giarrocco L., Salerno S.L.* Sucrose synthase and RuBisCo expression is similarly regulated by the nitrogen source in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. // *Planta.* 2006. V. 223. P. 891.
<https://doi.org/10.1007/s00425-005-0142-7>

СТРУКТУРА ХЛОРОЕНХИМЫ И ЛИПИДНЫЙ ПРОФИЛЬ МЕМБРАН В ЛИСТЯХ ГАЛОФИТОВ СЕМ. *Chenopodiaceae* С РАЗНЫМ ТИПОМ ФОТОСИНТЕЗА

© 2022 г. О. А. Розенцвет^{a, *}, Е. В. Шуйская^b, Е. С. Богданова^a, В. Н. Нестеров^a, Л. А. Иванова^{c, d}

^a Самарский федеральный исследовательский центр Российской академии наук,
Институт экологии Волжского бассейна Российской академии наук, Тольятти, Россия

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

^c Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический сад
Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

^d Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия

*e mail: olgarozen55@mail.ru

Поступила в редакцию 31.03.2021 г.

После доработки 19.04.2021 г.

Принята к публикации 20.04.2021 г.

Изучены структура мезофилла и липидный профиль мембран в листьях четырех видов галофитов сем. *Chenopodiaceae* с разным типом фотосинтеза: однолетников *Salicornia perennans* (C₃-тип фотосинтеза) и *Sedobassia sedoides* (C₃-C₄-тип), *Climacoptera crassa* (C₄-НАД-тип) и многолетнего полукустарничка *Kochia prostrata* (C₄-НАДФ-тип), произрастающих в биотопах с разной степенью засоления и увлажнения почвы. Однолетники с суккулентными листьями накапливали в 7–15 раз больше Na⁺, чем многолетний полукустарничек. Установлена тесная положительная взаимосвязь толщины листа с оводненностью листьев ($r = 0.98$, $P = 0.04$) и суммой накопленных элементов ($r = 0.96$, $P = 0.04$) в них. Клетки мезофилла C₃-вида *S. perennans* были существенно крупнее в сравнении с клетками мезофилла и обкладки C₄-видов и имели в 1.5–3.5 раза больше хлоропластов. Виды с Кранц-анатомией различались размерами и соотношением числа клеток обкладки и мезофилла. Суммарная площадь поверхности хлоропластов в единице площади листа у растений с Кранц-анатомией в клетках мезофилла оказалась выше, чем в клетках обкладки. Обнаружено сходство значений ассимилирующей поверхности мезофилла и хлоропластов у растений C₃- и C₃-C₄-типов фотосинтеза, а также C₄-НАД- и C₄-НАДФ-типов. Общее число клеток и число хлоропластов клеток мезофилла положительно коррелировали с содержанием общих липидов в расчете на единицу площади листа ($r = 0.95$, $P = 0.04$). Содержание кислоты 18:2(n-6) снижалось, а 18:1(n-9) увеличивалось в ряду C₃ → C₃-C₄ → C₄-НАД → C₄-НАДФ-видов. Сделан вывод, что увеличение различий между объемом и поверхностью клеток и хлоропластов мезофилла и обкладки проводящих пучков, а также снижение количества мембранных липидов клеток, хлоропластов и митохондрий в единице площади листа связано с выраженностью C₄-синдрома. Состав липидов и жирных кислот поддерживает метаболическую активность хлоропластов и митохондрий в зависимости от типа фотосинтеза.

Ключевые слова: *Chenopodiaceae*, тип фотосинтеза, суккулентность, мезоструктура листа, размеры клетки, хлоропласты, митохондрии, пигменты, липиды, жирные кислоты

DOI: 10.31857/S0015330322010171

ВВЕДЕНИЕ

Семейство, или клада *Chenopodiaceae* Vent. (*Amaranthaceae*) — один из самых разнообразных в структурно-функциональном отношении таксо-

нов растений. Согласно современным представлениям, *Chenopodiaceae* часто рассматривается в составе *Amaranthaceae* Juss. (s.l.) как приоритетного названия или как клада *Chenopodiaceae/Ama-*

Сокращения: ГЛ — гликолипиды; ДФГ — дифосфатидилглицерин; ДГДГ — дигалактозилдиацилглицерин; ЖК — жирные кислоты; Кар — каротиноиды; КОХ(М)/(BS) — объем клетки мезофилла/обкладки, приходящийся на один хлоропласт; МГДГ — моногалактозилдиацилглицерин; МЛ — мембранные липиды; ОЛ — общие липиды; СХДГ — сульфохиновозилдиацилглицерин; ФГ — фосфатидилглицерин; ФИ — фосфатидилинозит; ФЛ — фосфолипиды; ФХ — фосфатидилхолин; ФЭ — фосфофатидилэтанол-амин; Хл — хлорофиллы; Acell/A(M), Acell/A(BS) — суммарная площадь поверхности клеток мезофилла (М) или обкладки (BS) в единице площади листа; Achp/A(M)/Achp/A(BS) — суммарная площадь поверхности хлоропластов в клетках мезофилла/обкладки; NcellM/BS — число клеток мезофилла/ обкладки; NChpM/BS — число хлоропластов в клетках мезофилла/обкладки; VcellM/BS — объем клетки мезофилла/обкладки; VchpM/BS — объем хлоропласта в клетках мезофилла/обкладки; VchpM/VcellBS, VchpBS/VchpBS — относительный объем хлоропластов в клетке мезофилла/обкладки.

ranthaceae [1]. Большинство видов *Chenopodiaceae* адаптированы к галофитным, гипергалофитным, ксерофитным и ксерогалофитным сообществам или рудеральным местам обитания [2].

Структурно-функциональные свойства отражают разнообразие механизмов адаптации видов *Chenopodiaceae* к специфическим почвенно-климатическим условиям и определяют их экологические стратегии. Представители данного семейства способны регулировать поглощение солей, усиливая их внутриклеточную компартментацию (эугаллофиты) или ограничивая проникновение в метаболически активные части (крино- и гликогалофиты) [3, 4]. Среди них широко распространены виды с разными метаболическими типами фотосинтеза [3]. Виды с C_3 -типом фотосинтеза встречаются по всему градиенту засоления почв, вплоть до пухлых солончаков, на которых, например, произрастает однолетний C_3 -эугаллофит *Salicornia perennans*. На средне-засоленных участках часто встречаются виды с C_4 -НАД-МЭ типом фотосинтеза (аспартатный подтип C_4 -фотосинтеза), типичным представителем которых является однолетник *Climacoptera crassa*. Виды с C_4 -НАДФ-МЭ типом фотосинтеза (малатный подтип), например, полкустарничек *Kochia prostrata*, предпочитают менее засоленные и песчаные почвы [5]. Кроме того, в сем. *Chenopodiaceae* встречаются промежуточные C_3 – C_4 виды с C_2 -фотосинтезом, примером которых, на основе анатомических особенностей, а также анализа газообмена и иммунолокализации глициндекарбоксилазы [6], является однолетнее растение *Sedobassia sedoides*. Вид *S. sedoides* имеет специфическое анатомическое строение, которое выделено в отдельный тип – *Sedobassia* [7, 8].

В процесс фотосинтеза вовлечены сложные взаимодействия отдельных фотосистем, органелл, клеток и тканей листа для создания оптимального соотношения структуры и функции. Каждый из этих уровней организации фотосинтетического аппарата характеризуется определенными критериями, которые могут меняться в зависимости от внешних условий [9, 10]. Например, листовая архитектура определяется типом строения мезофилла листа, количеством, размерами и формой фотосинтезирующих клеток [11]. Интегральные параметры мезофилла, такие как число хлоропластов в единице площади листа и общая площадь поверхности мезофильных клеток и хлоропластов, характеризуют величину поверхности обмена для CO_2 и в значительной степени влияют на его проводимость [12]. Скорость диффузии CO_2 из межклеточных пространств мезофилла до стромы хлоропласта зависит также от проницаемости клеточной стенки и мембран клетки и хлоропласта.

Фотосинтезирующая органелла – хлоропласт – имеет двойную внешнюю оболочку и содержит внутренние тилакоидные мембраны [13]. Тилакои-

ды являются участками фотосинтеза, отвечая за световые реакции. В них локализованы четыре основные субъединицы: ФС I, ФС II, цитохром b6f и АТФ-синтаза. Обе ФС связывают хлорофиллы (Хл) и каротиноиды (Кар) и состоят из ядра и светособирающих комплексов (ССК). Структурными элементами мембран тилакоидов являются липиды: моногалактозилдиацилглицерин (МГДГ), дигалактозилдиацилглицерин (ДГДГ), сульфохинозиддиацилглицерин (СХДГ) и фосфорсодержащий липид фосфатидилглицерин (ФГ) [14].

Функции хлоропластов тесно связаны с митохондриями [15]. Обе органеллы в растительных клетках служат внутриклеточными энергетическими центрами, которые снабжают клетку энергией посредством деятельности дыхательных и фотосинтетических цепей, локализованных в мембранах. Для выполнения этой роли им требуется активный обмен ионами, метаболитами, липидами [16]. Митохондриальные мембраны растений содержат два преобладающих класса липидов – фосфатидилхолин (ФХ) и фосфофатидилэтаноламин (ФЭ), а также другие классы липидов – ФГ, фосфатидилинозит (ФИ) и специфичный для митохондрий дифосфатидилглицерин (ДФГ) [15]. Липиды в мембранах хлоропластов и митохондрий не только обеспечивают их целостность, но и поддерживают функциональную специфичность интегральных белков, вовлеченных в ионное гомеостатирование, фотохимические и электрон-транспортные и другие процессы [17].

Структурные и биохимические различия между видами с разными типами фотосинтеза на уровне строения фотосинтезирующих тканей и клеток хорошо известны [5]. В отличие от клеточного уровня, тонкие различия в структурной организации отдельных органелл между галофитами и гликофитами, а также галофитами с разным типом фотосинтеза остаются в значительной степени неизученными.

Цель работы – выявление мезо- и ультраструктурных особенностей фотосинтетических органов и тканей у галофитов сем. *Chenopodiaceae* с разными типами фотосинтетического метаболизма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Район исследования входит в состав Прикаспийской низменности. Климатические условия территории характеризуются недостаточным увлажнением, сильной засушливостью, особенно в весенне-летний период. Максимальная температура июля за последние 5 лет составила 41.4°C. Среднегодовое количество осадков – 181.9–190.0 мм, среднемесячная влажность воздуха наиболее теплого месяца – 47%, величина гидротермического коэффициента ~ 0.4 [18].

Растительный материал. Объектами исследования стали четыре галофита сем. *Chenopodiaceae* с разными типами фотосинтеза: однолетники солерос солончаковый (*Salicornia perennans* Willd., C₃-тип фотосинтеза) и седобассия очитковая (*Sedobassia sedoides* (Pall.) Freitag & Kadereit, промежуточный C₃-C₄-тип), климакоптера мясистая (*Climacoptera crassa* (M. Bieb.) Botsch., C₄-НАД-тип) и многолетний полукустарничек кохия распростертая (*Kochia prostrata* (L.) Schrad., C₄-НАДФ-тип). Для анализов использовали листья *C. crassa*, *S. sedoides*, *K. prostrata* и листья, сросшиеся с побегом у *S. perennans*. Образцы растений отбирали на площадках размером 20 x 20 м. Виды *C. crassa*, *K. prostrata* и *S. sedoides* произрастали на верхней надпойменной террасе в северо-западной части оз. Эльтон (49°10'12" с. ш., 46°34'30" в. д.), а *S. perennans* – в непосредственной близости от уреза воды (49°10'09" с. ш., 46°34'36" в. д.). Биоценоз первого экотопа представлен разреженным мятликово-прутняковым сообществом с участием черной полыни, тип почвы – солонец мелкий непромытый от солей. Второй экотоп представлен монодоминантным солеросовым сообществом, тип почвы – солончаки луговые.

Растительный материал отбирали в первой декаде июня 2018 г. в первой половине дня. Для биохимических анализов использовали полностью сформировавшиеся листья среднего яруса (или в случае *S. perennans* – среднюю часть побега) из 5–10 растений одного и того же вида в пределах одного экотопа. Для анализа пигментов отбирали навески по 0.5 г сырой массы, для липидов – по 1 г, для определения содержания воды и ионов – по 1 г. Для выделения фракций хлоропластов и митохондрий отбирали пробы по 5 г для каждого вида растений. Все образцы в трех биологических повторностях замораживали в жидком азоте и хранили вплоть до проведения анализа.

Содержание ионов в листьях (побегах) определяли в сухом размолотом материале после минерализации проб с применением метода оптической эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой на приборе Spectro Ciros-CCD (“SPECTRO Analytical Instruments”, Германия) [19].

Содержание воды определяли после высушивания образцов до постоянного веса при 60°C и выражали в % от сырой массы.

Количественные показатели мезоструктуры листа получены согласно методике анализа мезоструктуры листа и проекционного метода определения параметров клеток мезофилла [11]. Высечки свежих листьев 5–10 растений фиксировали в 3.5% растворе глутарового альдегида в фосфатном буфере (рН = 7.4) в полевых условиях. Число клеток в единице площади листа определяли в суспензии клеток, полученной после мацерации листовых высечек известной площади в 20% рас-

творе КОН при нагревании до кипения. Подсчитывали количество клеток мезофилла и обкладки (NcellM/BS) проводящих пучков в счетной камере Горяева под световым микроскопом Zeiss Axiostar (“Zeiss”, Германия) при увеличении ×200. Число хлоропластов в клетках (Chp) и размеры клеток измеряли в суспензии клеток после мацерации листовых высечек в 1NНСl при нагревании до 50°C в течение 10 мин. Объем клеток (Vcel) рассчитывали с помощью проекционного метода, используя для расчетов средние значения площади и периметра проекции и коэффициенты, зависящие от формы клетки. Двумерный коэффициент формы клетки K_{2d} рассчитывали, как безразмерное отношение квадрата периметра проекции к ее площади [11]. Размеры хлоропластов измеряли на поперечных срезах листьев, используя световой микроскоп Zeiss Axiostar и программу SIAMS Mesoplant (“SIAMS”, Россия). Путем умножения числа хлоропластов (Chp) в клетке на число клеток в единице площади листа мезофилла и обкладки определяли количество хлоропластов в единице площади листа (NchpM/BS). Клеточный объем одного хлоропласта (КОХ) – объем клетки, соответствующий одному хлоропласту (мкм³) – рассчитывали как отношение объема клетки к числу хлоропластов в ней, суммарную площадь поверхности клеток мезофилла (Ames/A(M) и обкладки (Ames/A(BS)) определяли в единице площади листа, см²/см².

Анализ фотосинтетических пигментов и расчет ССК. Содержание фотосинтетических пигментов определяли спектрофотометрически на приборе ПЭ-3000 УФ (ООО ПромЭкоЛаб, Россия) в ацетонной вытяжке (90%) при длинах волн 662, 664 нм (Хл *a*, *b*) и 470 нм (Кар). Расчет концентрации выделенных пигментов производили по методу [20]. Долю Хл в ССК рассчитывали по формуле $(1.2 \text{ Хл } b + \text{ Хл } a) / \sum (\text{Хл } a + \text{Хл } b)$.

Выделение и анализ хлоропластов и митохондрий. Навеску растений массой 5 г после извлечения из жидкого азота гомогенизировали с помощью фарфоровой ступки и пестика с добавлением 15 мл охлажденной среды выделения (0.5 М сахарозы, 50 мМтрис-НСl, 5 мМ ЭДТА, 5 мкМ меркаптоэтанол, рН 7.8), фильтровали через три слоя капрона. На первом этапе гомогенат центрифугировали 1 мин при 500 g для отделения тяжелых элементов клетки, затем супернатант центрифугировали 10 мин при 3500 g. В полученном осадке содержится фракция хлоропластов. Супернатант центрифугировали при 15000 g (при +4°C) в течение 15 мин для получения фракции митохондрий. Полученный осадок ресуспендировали в среде, содержащей 0.5 М сахарозы и 5 мМ Трис-НСl (рН 7.2) и центрифугировали при 15000 g (при +4°C) в течение 15 мин для получения очищенных митохондрий. Чистоту фракций хлоропластов и митохон-

Таблица 1. Содержание водорастворимых катионов и воды в надземной массе исследованных видов сем. *Chenopodiaceae* с разными типами фотосинтеза

Параметр	Виды растений			
	<i>S. perennans</i> (C ₃)	<i>S. sedoides</i> (C ₃ –C ₄)	<i>C. crassa</i> (C ₄ -НАД)	<i>K. prostrata</i> (C ₄ -НАДФ)
Ca ²⁺	0.6 ± 0.1c	5.3 ± 0.2a	<0.04d	1.0 ± 0.0b
Mg ²⁺	36.5 ± 0.2b	18.3 ± 0.1c	14.8 ± 0.2d	49.4 ± 0.3a
Na ⁺	612.4 ± 30.1c	856.5 ± 2.6b	1342.2 ± 14.6a	87.0 ± 0.4d
K ⁺	13.8 ± 2.9d	29.1 ± 0.4b	17.0 ± 1.4c	47.1 ± 0.4a
Σ катионов, % от сухой массы	17.8	11.1	17.7	1.2
H ₂ O, %	91.3 ± 2.2a	80.7 ± 7.0b	82.0 ± 4.0b	60.0 ± 5.0c

Примечание: разными буквами обозначены достоверные различия между видами растений при $P < 0.05$.

дрий проверяли с помощью электронного микроскопа JEM 100B (“JEOL”, Япония). Все операции проводили при температуре 4°C.

Липиды из листьев и из фракций хлоропластов и митохондрий экстрагировали смесью хлороформа и метанола 1 : 2 (по объему) и разделяли методом тонкослойной хроматографии. Экстракцию, разделение и анализ липидов осуществляли, как описано ранее [21]. Содержание общих липидов (ОЛ) рассчитывали как сумму проанализированных отдельно нейтральных липидов, гликолипидов (ГЛ) и фосфолипидов (ФЛ). Количество ФЛ, ГЛ и стериннов определяли денситометрически с помощью программы Денскан-04 (ООО НТЦ Ленхром, Россия), в отдельных случаях – с помощью специфических реакций на спектрофотометре ПЭ-3000 УФ. На денситометре хроматограммы анализировали в режиме параболической аппроксимации по калибровочным кривым, используя МГДГ и ФХ (“Sigma”, Германия) в качестве стандартов [22].

Жирные кислоты (ЖК) анализировали в виде их метиловых эфиров, используя газовый хроматограф Кристалл-5000.1 (ЗАО СКБ Хроматэк, Россия), в изотермическом режиме на капиллярной колонке Rtx T-2330 (“Restek”, США) длиной 105 м и диаметром 0.25 мм. Температура колонки – 180°C, испарителя и детектора – 260°C, скорость тока газа-носителя (гелий) – 2 мл/мин.

Анализ каждого компонента проводили трижды в каждой биологической пробе. В таблицах и рисунках приведены средние арифметические значения (M) со стандартной ошибкой (±SE). Сравнение количественных признаков данных проводилось с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One-way ANOVA). Расчеты выполняли в программах Statistica 6.0 for Windows, Past 3 и Microsoft Excel 2007. Для выявления информативных признаков, характеризующих

растения с разным типом фотосинтеза, был использован метод главных компонент PCA.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Содержание катионов и воды в надземной массе растений

Все исследованные виды преимущественно накапливали ионы Na⁺. При этом в клетках однолетних суккулентными листьями накапливалось в 7–15 раз больше Na⁺, чем многолетнего полукустарничка *K. prostrata*. Различались растения и по накоплению ионов K⁺, большая концентрация которых обнаружена в клетках *K. prostrata*. Содержание ионов Mg²⁺ в побегах травянистого однолетника *S. perennans* и листьях полукустарничка *K. prostrata* было в 2–3 раза больше по сравнению с однолетниками *C. crassa* и *S. sedoides*. Количество ионов Ca²⁺ в листьях изученных видов было низким, за исключением C₃–C₄-вида *S. sedoides* (табл. 1). Содержание основных одно- и двухвалентных катионов в надземной массе исследованных галофитов в пересчете на сухую массу суммарно составляло от 1.2 до 18%.

Количественные параметры мезоструктуры листа

Анализ параметров мезоструктуры листа показал, что C₃-вид *S. perennans* имел недифференцированную по форме клеток хлоренхиму в фотосинтезирующих побегах. У C₃–C₄-вида и двух C₄-видов, обладающих Кранц-анатомией, ткани дифференцированы на мезофилл и хлорофиллсодержащую обкладку проводящих пучков. Число фотосинтезирующих клеток у C₃-вида *S. perennans* было в 2–5 раз ниже, чем суммарное число хлорофиллоносных клеток у других видов растений. В листьях C₃–C₄-вида и C₄-видов содержалось большее

Таблица 2. Морфологические параметры листа видов сем. *Chenopodiaceae* с разным типом фотосинтеза

Параметр	Виды растений			
	<i>S. perennans</i> (C ₃)	<i>S. sedoides</i> (C ₃ –C ₄)	<i>C. crassa</i> (C ₄ -НАД)	<i>K. prostrata</i> (C ₄ -НАДФ)
Толщина листа, мкм	2300 ± 120a	430 ± 3.4c	870 ± 12b	370 ± 7d
Число клеток мезофилла (М) 10 ³ см ⁻²	247 ± 11d	577 ± 5b	411 ± 10c	881 ± 80a
Число клеток обкладки (BS) 10 ³ см ⁻²	–	77 ± 5c	120 ± 5b	392 ± 6a
Общее число клеток 10 ³ см ⁻²	247 ± 11d	654 ± 5b	531 ± 10c	1237 ± 73a
Отношение числа клеток, М/BS		7	3.4	2.2
Число хлоропластов в клетке М, шт.	110 ± 10a	43 ± 3b	19 ± 2c	12 ± 1d
Число хлоропластов в клетке BS, шт.	–	37 ± 3a	39 ± 4a	15 ± 3b

Примечание: разными буквами обозначены достоверные различия между видами растений при $P < 0.05$.

число клеток мезофилла по сравнению с клетками обкладки. При этом число клеток обкладки увеличивалось в ряду видов C₃–C₄ – C₄-НАД – C₄-НАДФ (табл. 2).

Параметры фотосинтезирующих клеток характеризовались высокой степенью видоспецифичности. Клетки мезофилла C₃-вида *S. perennans* были существенно крупнее в сравнении с клетками мезофилла и обкладки C₄-видов (рис. 1а) и имели в 1.5–3.5 раз больше хлоропластов. Виды с Кранц-анатомией различались размерами и соотношением числа клеток обкладки и мезофилла. Клетки обкладки и мезофилла у C₃–C₄-вида *S. sedoides* имели равные размеры. У C₄-вида *C. crassa* объем клеток обкладки был в 2.5 раза больше, чем объем клеток мезофилла, а у *K. prostrata* это отношение увеличивалось до 5. При этом пластиды у *C. crassa* и *S. sedoides* в клетках мезофилла и обкладки были сходными по размерам, сравнимые с размерами хлоропластов у C₃-вида (рис. 1б). В отличие от них, у *K. prostrata* хлоропласты в клетках обкладки имели большие размеры, чем в клетках мезофилла. У *C. crassa* число хлоропластов в клетках обкладки было вдвое выше, чем в мезофилле, а у *K. prostrata* и *S. sedoides* количество хлоропластов в обоих типах клеток достоверно не отличалось. Объем, приходящийся на один хлоропласт, в клетках мезофилла оказался наибольшим у C₃-вида, а в клетках обкладки – у C₄-НАДФ-вида (рис. 1в). Однако суммарно хлоропласты C₄-видов занимали больший объем клетки, чем C₃- и C₃–C₄-видов (рис. 1г).

Размеры клеток и хлоропластов и их число в единице площади листа определяли общую ассимилирующую поверхность хлоренхимы (Ames/A) и суммарную площадь поверхности хлоропластов (Achrp/A). Ассимилирующая поверхность клеток мезофилла у видов *S. perennans* и *S. sedoides* была равна по величине и в 2–3 раза больше, чем у C₄-видов (рис. 1д). Суммарная площадь поверхности

хлоропластов в единице площади листа (Achrp/A) у растений с Кранц-анатомией в клетках мезофилла была больше, чем в клетках обкладки (рис. 1е). В целом наблюдалось сходство значений ассимилирующей поверхности мезофилла и хлоропластов (Ames/A и Achrp/A) у растений с C₃- и C₃–C₄-типом фотосинтеза, а также C₄-НАД- и C₄-НАДФ-типом (рис. 1д, е), хотя у растений малатного метаболического подтипа фотосинтеза показатель Ames/A выше, чем у аспартатного подтипа.

Содержание фотосинтетических пигментов

Суммарное содержание Хл между отдельными видами различалось в 1.7 раз (табл. 3). Меньшая концентрация Хл обнаружена у C₄-НАД-вида *C. crassa*. Для C₃-вида *S. perennans* характерным оказалось низкая величина показателя отношения Хл a/b , но большая доля Хл, локализованного в ССК. Максимальным значением отношения Хл a/b , но при этом низким отношением Хл/Кар, характеризовался C₄-НАДФ-вид *K. prostrata*.

Липиды и жирные кислоты

Содержание ОЛ в клетках и органеллах галофитов представлено в таблице 4. Количество мембранных липидов, включая ГЛ, ФЛ и стерин, составляло от 68 (*K. prostrata*) до 88% (*C. crassa*) от общего содержания липидов клетки (табл. 4). Более низкое содержание мембранных липидов в клетках *K. prostrata* связано с накоплением нейтральных липидов, выполняющих, в основном, запасующую функцию.

Более подробный анализ состава липидов, определяющих мембраны хлоропластов показал, что по относительному вкладу отдельных классов липидов у *S. sedoides* доминировал МГДГ, у остальных видов относительные количества МГДГ и ДГДГ были равны (рис. 2). Для C₃-вида *S. perennans*

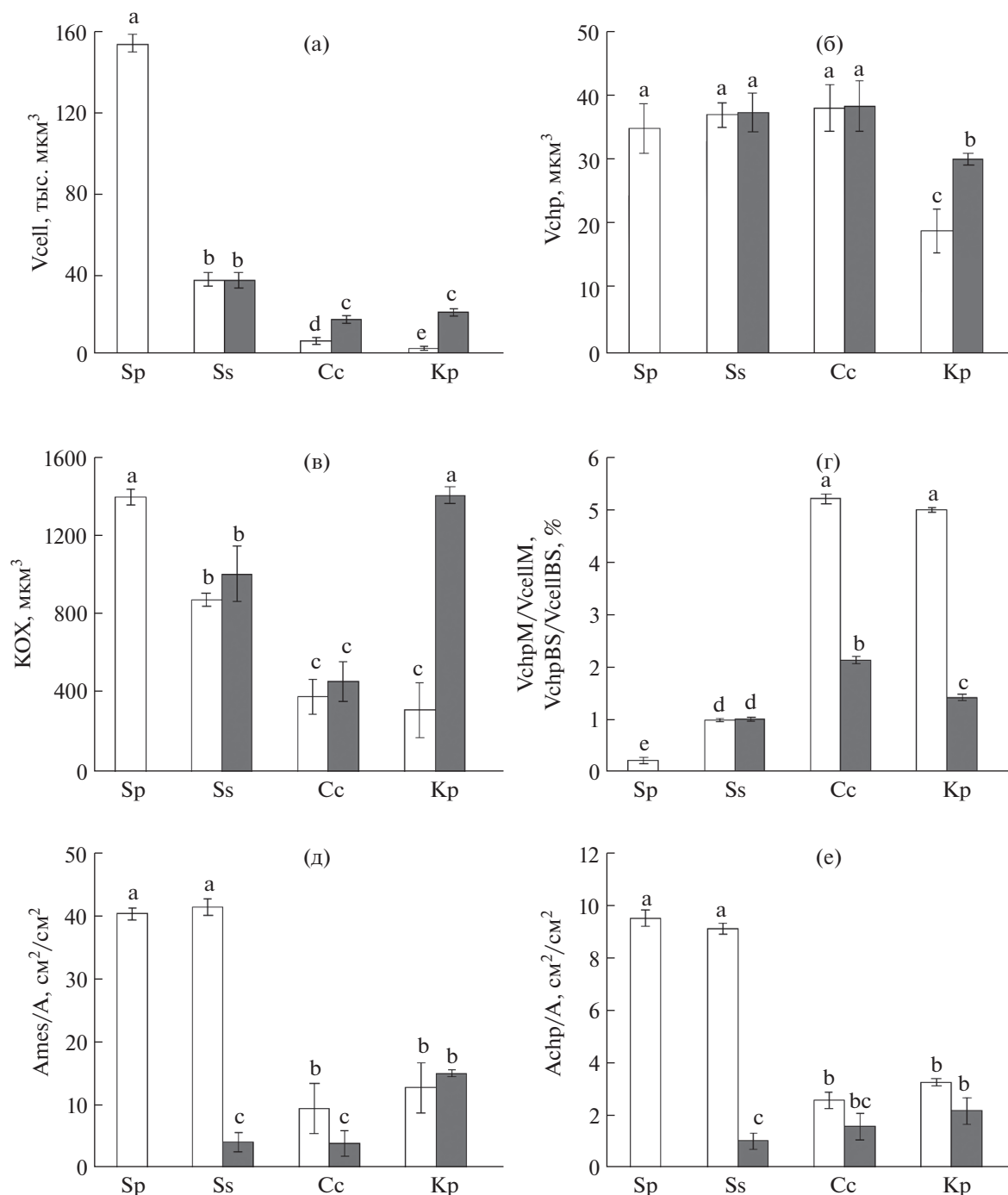


Рис. 1. Объемные параметры мезофила листа изученных видов сем. *Chenopodiaceae*: а – объем клетки мезофила/обкладки (V_{cell}); б – объем хлоропласта (V_{chp}); в – объем клетки, приходящийся на один хлоропласт (КОХ); г – относительный объем хлоропластов в клетке мезофила/обкладки (V_{chpM}/V_{cellM}); д – суммарная площадь поверхности клеток мезофила/обкладки (A_{cell}/A) в единице площади листа; е – суммарная площадь поверхности хлоропластов в клетках мезофила/обкладки (A_{chp}/A). 1 – мезофилл, 2 – обкладка. Сс – *C. crassa*, Кр – *K. prostrate*, Ss – *S. sedoides*, Sp – *S. perennans*. Примечание. Разными буквами обозначены достоверные различия между видами растений при $P < 0.05$.

nans характерно одинаковое содержание анионных липидов ФГ и СХДГ, а для C_4 -НАДФ-вида *K. prostrata* – большее содержание ФГ, чем СХДГ.

В составе липидов митохондрий исследованных видов доминировал ФХ (36–57% от суммы ФЛ). У

всех видов обнаружено высокое относительное содержание фосфатидной кислоты (ФК) – около 20%). Кроме того, у C_4 -видов в составе липидов оказалась высокая доля ФГ (13–16% от суммы липидов против 6–8% у *S. perennans* и *S. sedoides*, со-

Таблица 3. Состав и содержание пигментов (мг/г сухой массы) в листьях исследованных видов сем. *Chenopodiaceae*

Параметр	Виды растений			
	<i>S. perennans</i> (C ₃)	<i>S. sedoides</i> (C ₃ –C ₄)	<i>C. crassa</i> (C ₄ -НАД)	<i>K. prostrata</i> (C ₄ -НАДФ)
Хл <i>a</i>	1.95 ± 0.19c	2.90 ± 0.30a	1.70 ± 0.21c	2.24 ± 0.22b
Хл <i>b</i>	0.92 ± 0.06a	0.83 ± 0.04a	0.57 ± 0.05b	0.57 ± 0.06b
Кар	0.69 ± 0.01b	0.98 ± 0.06a	0.51 ± 0.03c	0.70 ± 0.03b
Хл <i>a/b</i>	2.13	3.50	3.00	3.93
Хл/Кар	4.17	3.79	4.44	4.01
ССК, %	70.4	48.9	55	44.6

Примечание: разными буквами обозначены достоверные различия между видами растений при $P < 0.05$.

Таблица 4. Общие и мембранные липиды клетки, выделенные из тканей листьев галофитов сем. *Chenopodiaceae* с разным типом фотосинтеза

Клетка/ органелла	Липиды, мкг/см ² листа			
	<i>S. perennans</i> (C ₃)	<i>S. sedoides</i> (C ₃ –C ₄)	<i>C. crassa</i> (C ₄ -НАД)	<i>K. prostrata</i> (C ₄ -НАДФ)
ОЛ клетки	950 ± 94a	910 ± 89a	940 ± 30a	310 ± 30b
МЛ клетки	790 ± 80a	740 ± 60a	830 ± 30a	210 ± 25b

Примечание: разными буквами обозначены достоверные различия между видами растений при $P < 0.05$.

ответственно). В целом, в митохондриях наблюдалась тенденция увеличения содержания ФГ в ряду C₃ → C₃₋₄ → C₄. Содержание специфического для митохондрий липида ДФГ варьировало в интервале 5–8%.

В липидах хлоропластов и митохондрий галофитов, также как в суммарных липидах клетки, преобладали ЖК с длиной цепи 16 и 18 атомов углерода (табл. 5). Относительное содержание пальмитиновой (16:0), линолевой (18:2(n-6)) и α-линоленовой (18:3(n-3)) кислот составляло более 90% у всех видов растений. Сравнение состава ЖК исследованных видов с данными литературы показывает общую закономерность распределения ненасыщенных ЖК от наибольшего содержания α-линоленовой кислоты к наименьшему олеиновой кислоты 18:1(n-9), а также преобладание среди насыщенных ЖК 16:0 [23]. Однако состав ЖК в липидах обеих фракций C₄-видов отличался от C₃-вида *S. perennans* высоким, пятикратно превышающим относительным содержанием 18:1(n-9) и меньшим количеством 18:2(n-6). Относительное содержание основной насыщенной ЖК 16:0 было наименьшим у C₄-НАДФ-вида как в хлоропластах, так и митохондриях.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами результаты показывают, что исследованные галофиты сем. *Chenopodiaceae* обладают разными биохимическими типами фотосинтеза, разной регуляцией водно-солевого обмена и жизненной стратегией. Содержание ионов Na⁺, также как суммарное содержание ионов у однолетних трав *S. perennans* (C₃-вид), *S. sedoides* (C₃–C₄-вид) и *C. crassa* (C₄-НАД-вид) многократно выше, чем у многолетнего полукустарничка *K. prostrata* (C₄-НАДФ-вид). Большее содержание ионов у однолетних растений связано с высокой долей суккулентности их листьев – необходимой чертой для поддержания осмотического баланса у растений-галофитов с поверхностной корневой системой. Многолетний полукустарничек *K. prostrata* отличается более длинными (до 6.5 м) корнями, благодаря чему имеет возможность добывать воду из более глубоких слоев почвы. Расчет коэффициентов корреляции для всех видов растений показал тесную положительную взаимосвязь толщины листа с оводненностью листьев ($r = 0.98$, $P = 0.04$), а также с суммой накопленных элементов в расчете на сухую массу листа ($r = 0.96$, $P = 0.04$).

Согласно современным представлениям, эволюция фотосинтетического углеродного метаболизма высших растений шла по пути формирования “над-

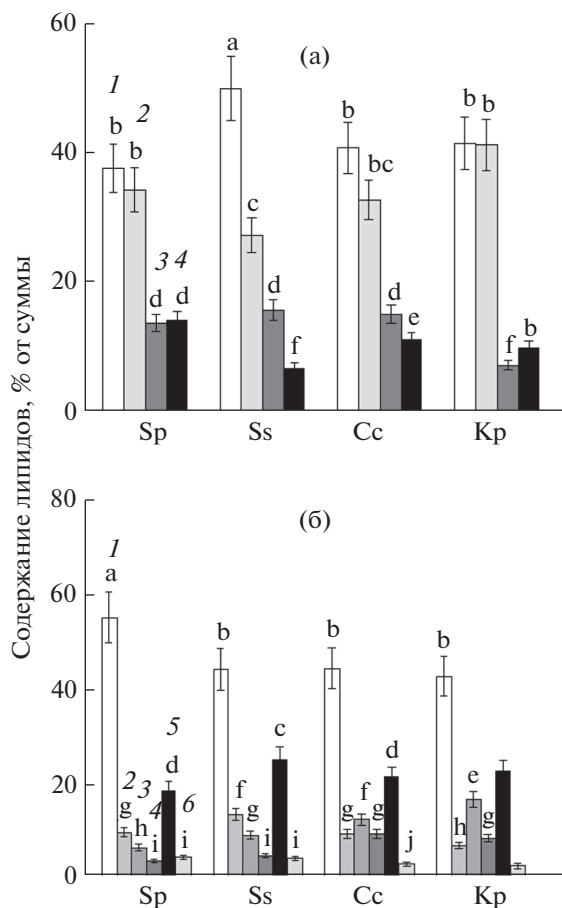


Рис. 2. Состав ГЛ (а) и ФЛ (б) мембран хлоропластов и митохондрий галофитов сем. *Chenopodiaceae* с разным типом фотосинтеза: Сс – *C. crassa*, Кр – *K. prostrata*, Ss – *S. sedoides*, Sp – *S. perennans*. (а) 1 – МГДГ, 2 – ДГДГ, 3 – СХДГ, 4 – ФГ; (б) 1 – ФХ, 2 – ФЭ, 3 – ФГ, 4 – ФИ, 5 – ФК, 6 – ДФГ. Разными буквами обозначены достоверные различия между видами растений при $P < 0.05$.

строек” к восстановительному пентозофосфатному циклу Бенсона–Кальвина C_3 -растений, сопряженного с изменением характеристик клеток и их генетическим контролем в ряду $C_3 \rightarrow C_3-C_4 \rightarrow C_4$ [24]. Анатомическая структура листьев высших C_3 -растений обычно представлена клетками палисадной и губчатой паренхимы, не отличающимися по типу метаболизма. Диморфные и функционально разные фототрофные ткани считаются необходимым условием функционирования C_4 -фотосинтеза [25]. Растения с промежуточным типом фотосинтеза, такие как *S. sedoides*, имеют Кранц-подобную структуру листа с клетками обкладки, которые отличаются от обычных клеток мезофилла более компактной округлой формой, утолщенными стенками и специфическим расположением хлоропластов и митохондрий вдоль внутренней периклинальной и антиклинальной стенок [8].

В наших исследованиях фотосинтетическую функцию C_3 -вида *S. perennans* выполняет стебель с однотипной крупноклеточной внутренней паренхимой с большим содержанием воды, что соответствует галоморфному типу строения. У растений с дифференцированной хлоренхимой просматривается уменьшение отношения числа клеток мезофилла к обкладке с нарастанием C_4 синдрома в ряду *S. sedoides* (C_3-C_4) > *C. crassa* (C_4 -НАД) > *K. prostrata* (C_4 -НАДФ) (табл. 2). В такой же последовательности менялось отношение размеров клеток мезофилла к клеткам обкладки.

Фотосинтетический потенциал листа зависит от интегральных параметров мезофилла, определяемых числом клеток и хлоропластов и их размерами. Так, общие поверхности клеток мезофилла и хлоропластов в единице площади листа у однолетников с C_3 - и C_3-C_4 -типом фотосинтеза практически равны, но в 4 раза выше, чем у однолетника и многолетника с C_4 -типом фотосинтеза. У *K. prostrata* – слабого соленакопителя – выявлено самое большое число клеток и самое низкое число хлоропластов в клетках. Можно полагать, что количественные и качественные показатели мезоструктуры листа галофитов сем. *Chenopodiaceae* зависят как от проявления C_4 -синдрома, так и жизненной формы.

Сравнивая площадь поверхности клеток у двух C_4 -видов, можно увидеть различия в показателе величины общей поверхности мезофилла. У *K. prostrata* Ames/A доля клеток мезофилла выше, чем у *C. crassa* в 1.3 раза, а поверхность клеток обкладки в 3.7 раз, за счет большего числа клеток. Площадь поверхности хлоропластов в клетках обкладки у *K. prostrata* также выше в 1.3 раза по сравнению с *C. crassa*. Известно, что фотосинтетический аппарат НАДФ-МЭ более дифференцирован по сравнению с НАД-МЭ как в структурном, так и биохимическом отношении [26]. У растений аспартатного подтипа система метаболизации C_4 -кислот связана только с митохондриями. У C_4 -малатных растений функция декарбоксилирования перешла к хлоропластам вместе с появлением специализированной малатдегидрогеназы – НАДФ-МЭ [27]. Все эти особенности отразились на количественных параметрах клетки и хлоропластов C_4 -видов галофитов, имеющих разные биохимические пути усвоения CO_2 . Обнаружена положительная взаимосвязь содержания ОЛ на единицу площади листа с общим числом клеток ($r = 0.95$, $P = 0.04$) и величиной общей поверхности клеток ($r = 0.94$ при $P < 0.06$). На уровне строения тилакоидов НАДФ-МЭ-типу соответствует наличие крупных гран в хлоропластах мезофилла и агранульные или слабогранульные хлоропласты обкладки. В хлоропластах клетки обкладки растений этого подтипа снижена активность ФС II за счет дефи-

Таблица 5. Состав жирных кислот липидов клетки, хлоропластов и митохондрий галофитов сем. *Chenopodiaceae* с разным типом фотосинтеза, % от суммы ЖК

ЖК ¹	Виды растений			
	<i>S. perennans</i> (C ₃)	<i>S. sedoides</i> (C ₃ –C ₄)	<i>C. crassa</i> (C ₄ -НАД)	<i>K. prostrata</i> (C ₄ -НАДФ)
Клетка				
16:0	24.8 ± 1.4a	18.7 ± 1.7b	21.6 ± 1.8b	19.4 ± 1.6b
16:1(n-9)	1.6 ± 0.1b	1.6 ± 0.1b	1.7 ± 0.1b	2.0 ± 0.1a
18:0	2.1 ± 0.2a	2.1 ± 0.2a	1.9 ± 0.1a	1.9 ± 0.1a
18:1(n-9)	4.1 ± 0.3c	16.5 ± 1.1b	19.7 ± 1.7a	4.1 ± 0.2c
18:2(n-6)	22.0 ± 2.1a	10.3 ± 0.9c	16.8 ± 1.3b	9.0 ± 0.8c
18:3(n-3)	40.3 ± 2.1a	46.0 ± 3.2a	35.1 ± 1.8b	43.9 ± 2.7a
Другие ЖК	5.1 ± 0.4b	4.8 ± 0.4b	3.2 ± 0.2c	19.7 ± 1.5a
Хлоропласты				
16:0	26.3 ± 1.1b	19.9 ± 1.7a	23.0 ± 0.5c	18.0 ± 0.2
16:1(n-9)	2.1 ± 0.2b	2.2 ± 0.1b	1.7 ± 0.1c	3.3 ± 0.2a
18:0	2.5 ± 0.2a	1.9 ± 0.2b	2.4 ± 0.2a	2.2 ± 0.1ab
18:1(n-9)	3.3 ± 0.3c	15.3 ± 1.2b	16.7 ± 1.4ab	19.0 ± 1.2a
18:2(n-6)	17.6 ± 1.5a	12.4 ± 0.9b	13.2 ± 1.1b	8.0 ± 1.0c
18:3(n-3)	44.5 ± 1.8a	44.3 ± 1.5a	37.3 ± 2.5b	43.0 ± 2.4a
Другие ЖК	3.7 ± 0.4b	4.0 ± 0.4b	5.7 ± 0.6a	6.5 ± 0.6a
Митохондрии				
16:0	34.3 ± 2.0a	21.7 ± 1.7b	24.7 ± 1.4b	18.0 ± 1.0c
16:1(n-9)	1.6 ± 0.1b	1.7 ± 0b	1.6 ± 0.1b	2.0 ± 0.2a
18:0	3.6 ± 0.3a	3.4 ± 0.4a	2.3 ± 0.3b	2.0 ± 0.2b
18:1n9c	6.5 ± 1.0c	16.9 ± 1.9b	19.5 ± 1.5ab	20.6 ± 0.6a
18:2n6c	23.2 ± 1.0a	10.3 ± 0.3c	16.6 ± 1.0b	9.4 ± 0.4d
18:3n3	25.0 ± 2.0c	40.6 ± 1.6a	31.4 ± 1.4b	40.3 ± 1.3a
Другие ЖК	5.8 ± 0.5b	5.4 ± 0.4b	3.9 ± 0.4c	7.7 ± 0.5a

Примечание: ¹ среди других ЖК присутствовали 12:0, 14:0, 16:1(n-7), 20:0, 20:1, 22:0, 24:0. Разными буквами обозначены достоверные различия между видами растений при $P < 0.05$.

цита гран, а в клетках мезофилла преобладают хлоропласты гран, содержащие как ФС II, так и ФС I. Клетки мезофилла подтипа НАД–МЭ имеют низкое содержание гран в хлоропласте и обладают высокой активностью ФС I, тогда как клетки обкладки, напротив, обогащены гранами с активной ФС II [28]. Образование и функционирование внутреннего пространства хлоропластов, в частности формирование гран, зависит, в том числе, от количества и состава пигментов и липидного профиля. Так, Хл *b* выступает в качестве основного регулятора размера антенны фотосинтетического аппарата и участвует в поддержании надмолекулярной организации тилакоидных мембран. В отличие от Хл *a*, который входит в состав реакционных центров и антенных комплексов ФС, Хл *b* локализуется в ССК ФС II. В хлоропластах мутантов с нарушениями биосинтеза Хл *b* снижена спо-

собность образовывать граны, а также изменен характер упаковки пигмент-белковых комплексов в гранальной мембране. Обнаруженное снижение концентрации Хл *b* с нарастанием С₄ синдрома в исследованных галофитах (табл. 3) может быть связано с уменьшением количества гран в тилакоидном пространстве хлоропластов обоих типов клеток.

Хорошо известно, что эффективность работы субъединиц фотосинтетического аппарата, локализованных в мембранах тилакоидов, в значительной степени определяется физическим состоянием бислоя мембран. Создание оптимальной для функционирования мембранных белков среды определяется степенью ненасыщенности ЖК, балансом между стабилизирующими бислоем липидами (“бислойные” и “небислойные”), а также количеством стеринов [13, 23]. Наиболее

значимые события в составе ЖК в липидах клетки и органелл исследованных галофитов связаны с кислотами 18:1(n-9) и 18:2(n-6), а именно снижением содержания второй и увеличением первой в ряду $C_3 \rightarrow C_3-C_4 \rightarrow C_4$ - НАД \rightarrow C_4 -НАДФ-видов. Наличие в мембранных липидах 18:2(n-6) является критическим и достаточным условием для формирования характерной для организма текучести мембраны [23]. Снижение концентрации 18:2(n-6) способствует более плотной упаковке бислоя и меньшей его проницаемости. Благодаря способности C_4 -растений концентрировать CO_2 в клетках, по-видимому, отпадает необходимость в повышенной проводимости мембран.

В отношении показателя, характеризующего соотношение “бислойных” и “небислойных” липидов, таких как МГДГ и ДГДГ в хлоропластах, связи с типом фотосинтеза не установлено. В липидах митохондрий отмечено высокое накопление ФГ, особенно у C_4 -видов (рис. 3в). По некоторым сведениям, накопление в органеллах ФГ может облегчать транспорт метаболитов через мембраны [29], что особенно важно для C_4 -растений с диморфными клетками и органеллами. Среди липидов митохондрий обнаружено также необычно высокое содержание ФК. Как правило, содержание этого класса липидов в митохондриях растений не превышает 1%. Липиды данного типа, подобно МГДГ и ФЭ, склонны к образованию гексагональной фазы, вследствие чего не способны образовывать классический бислой [29], но обеспечивают формирование мембран с большим количеством изгибов. Высокое относительное содержание ФК (более 20%) в мембранных липидах отражало общую закономерность для исследуемых растений. В липидах мембран митохондрий обнаружено такое же высокое содержание полиеновых ЖК, как и в мембранах клетки и пластид с такой же направленностью изменения содержания 18:2(n-6) и 18:3(n-3).

Необходимо добавить, что мембранные системы галофитов важны не только для обеспечения фотосинтетической функции, но и для транспорта ионов [16]. Поддержание Na^+/K^+ гомеостаза клетки, кроме эффективности работы трансмембранных переносчиков, может зависеть от состава и свойств клеточных мембран, структуры клетки и ее размеров. Для выявления характеристик, связанных с усилением C_4 -синдрома и аккумуляции Na^+ , а также возможных взаимосвязей между показателями мезо- и ультраструктуры листа, был использован многофакторный анализ по методу главных компонент. Для основного набора характеристик было создано двухфакторное пространство на основе корреляционной матрицы. Фактор 1 описывает 79% общей вариации, фактор 2 – 13% (рис. 3). Вектор “тип фотосинтеза” (тип ФС) обозначает переход от C_3 -типа к промежуточному C_3-C_4 – и далее к

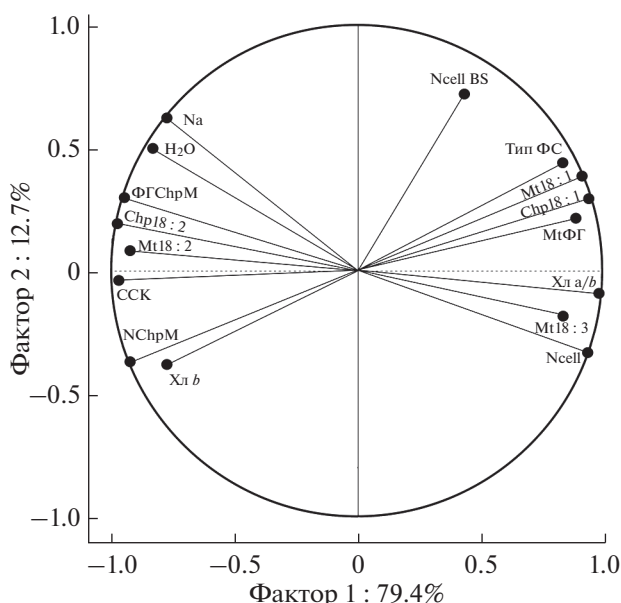


Рис. 3. Анализ взаимосвязи мезоструктурных и биохимических показателей с типом фотосинтеза растений методом PCA. Обозначения векторов: Тип ФС – тип фотосинтеза; Na – содержание натрия в листьях; H₂O – оводненность листьев; Ncell – число клеток; NcellBS – число клеток обкладки; N_{ChpM} – число хлоропластов в клетках мезофилла; Мт_{ФГ} – содержание ФГ в митохондриях; Мт_{18:1} – содержание 18:1(n-9) в митохондриях; Мт_{18:2} – содержание 18:2(n-6) в митохондриях; Мт_{18:3} – содержание 18:3(n-3) в митохондриях; ФГ_{ChpM} – содержание ФГ в хлоропластах мезофилла; Chp_{18:1} – содержание 18:1(n-9) в хлоропластах; Chp_{18:2} – содержание 18:2(n-6) в хлоропластах; Хл a/b – отношение хлорофиллов a/b; Хл b – содержание хлорофилла b; ССК – доля хлорофиллов в светособирающем комплексе.

C_4 -типу фотосинтеза. Он положительно связан с фактором 1 ($r = 0.86$) и с фактором 2 ($r = 0.41$). Вектор “содержание Na^+ ” (Na) отражает накопление Na^+ в листьях, данный вектор отрицательно взаимосвязан с фактором 1 ($r = -0.78$) и положительно с фактором 2 ($r = 0.62$). Однонаправленность векторов “тип ФС” и векторов таких переменных, как число клеток обкладки (NcellO), содержание кислоты 18:1(n-9) в хлоропластах (Chp_{18:1}) и митохондриях (Мт_{18:1}), содержание ФГ (Мт_{ФГ}) и 18:3(n-3) в митохондриях (Мт_{18:3}), отношение Хл a/b (a/b), говорит о положительной корреляции, которая тем сильнее, чем ближе они находятся друг к другу. Обратная связь установлена с такими переменными как содержание Хл b и число хлоропластов в клетках мезофилла (N_{ChpM}). С вектором “содержание Na” больше всего связан показатель оводненности листа (H₂O). Такие показатели, как содержание ФГ в хлоропластах мезофилла (ФГChpM), содержание кислоты 18:2(n-6) в хлоропластах (Chp18:2) и митохондриях (Мт18:2), доля Хл в ССК, также имели положительную связь с накоплением Na^+ .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Накопление ионов солей в листьях видов сем. *Chenopodiaceae* тесно связано с толщиной фотосинтетических органов и степенью их суккулентности, но не со степенью выраженности C_4 -синдрома. Выраженность C_4 -синдрома у изученных представителей сем. *Chenopodiaceae* проявляется в мезо- и ультраструктурных характеристиках листьев, прежде всего, в увеличении различий между объемом и поверхностью клеток и хлоропластов мезофилла и обкладки проводящих пучков, а также в снижении количества мембранных липидов клеток, хлоропластов и митохондрий в единице площади листа. Это способствует функциональной разгрузке фотосинтетических органов и снижению затрат на построение единицы площади листа. Увеличение концентрации ФГ в митохондриях, а также 18:1(n-9) в липидах митохондрий и хлоропластов происходит при усилении C_4 -синдрома. Вероятно, выраженность C_4 -типа фотосинтеза тесно связана с метаболической активностью хлоропластов и митохондрий.

Работа выполнена в рамках плана научных исследований в соответствии с государственным заданием № АААА-А17-117112040039-7, подтема 1.8 “Изучение механизмов адаптации в регуляции устойчивости ресурсных видов растений в экосистемах в связи с прогнозируемым изменением климата”, а также при поддержке проекта Министерства науки и высшего образования FEWZ-2020-0009.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сухоруков А.П. Карпология семейства *Chenopodiaceae* в связи с проблемами филогении, систематики и диагностики его представителей. Тула: Гриф и К, 2014. 400 с.
2. Kühn U. *Chenopodiaceae* // The families and genera of vascular plants. V. 2: Flowering Plants, Dicotyledons: Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid families / Eds. Kubitzki K., Rohwer J.G., Bittrich V. New York: Springer, 1993. P. 253.
3. Flowers T.J., Colmer T.D. Plant salt tolerance: adaptations in halophytes // *Ann. Bot.* 2015. V. 115. P. 327. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu267>
4. Shabala S., Mackay A. Ion transport in halophytes // *Advan. Bot. Res.* 2011. V. 57. P. 151. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387692-8.00005-9>
5. P'yankov V.I., Ziegler H., Hossein A., Deigele C. Lüttge U. European plants with C_4 photosynthesis: geographical and taxonomic distribution and relations to climate parameters // *Bot. J. Linnean Soc.* 2010. V. 163. P. 283. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2010.01062.x>
6. Voznesenskaya E.V., Koteyeva N.K., Akhani H., Roalson E.H., Edwards G.E. Structural and physiological analyses in *Salsola* (*Chenopodiaceae*) indicate multiple transitions among C_3 , intermediate, and C_4 photosynthesis // *J. Exp. Bot.* 2013. V. 64. P. 3583. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert191>
7. Ueno O. Structural and biochemical characterization of the C_3 - C_4 intermediate *Brassica gravinae* and relatives, with particular reference to cellular distribution of Rubisco // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 5347. <https://doi.org/10.1093/jxb/err187>
8. Freitag H., Kadereit G. C_3 and C_4 leaf anatomy types in *Camphorosmeae* (*Camphorosmoideae*, *Chenopodiaceae*) // *Plant Syst. Evol.* 2014. V. 300, 665. <https://doi.org/10.1007/s00606-013-0912-9>
9. Cornelissen J.H.C., Lavorel S., Garnier E., Díaz S., Buchmann N., Gurvich D.E., Reich P.B., ter Steege H., Morgan H.D., van der Heijden M.G.A., Pausas J.G.H., Poorter H.A. Handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide // *Austral. J. Bot.* 2003. V. 51. P. 335. <https://doi.org/10.1071/BT02124>
10. Ivanova L.A., Yudina P.K., Ronzhina D.A., Ivanov L.A., Hölzl N. Quantitative mesophyll parameters rather than whole-leaf traits predict response of C_3 steppe plants to aridity // *New Phytol.* 2018. V. 217. P. 558. <https://doi.org/10.1111/nph.14840>
11. Ivanova L.A., P'yankov V.I. Structural adaptation of the leaf mesophyll to shading // *Russ. J. Plant Physiol.* 2002. V. 49. P. 419. <https://doi.org/10.1023/A:1015513607202>
12. Terashima I., Miyazawa S.I., Hanba Y.T. Why are sun leaves thicker than shade leaves? Consideration based on analyses of CO_2 diffusion in the leaf // *J. Plant Res.* 2001. V. 114. P. 93. <https://doi.org/10.1007/PL00013972>
13. Kobayashi K. Role of membrane glycerolipids in photosynthesis, thylakoid biogenesis and chloroplast development // *J. Plant Res.* 2016. V. 129. P. 565. <https://doi.org/10.1007/s10265-016-0827-y>
14. Hölzl G., Witt S., Gaude N., Melzer M., Schöttler M.A., Dörmann P. The role of diglycosyl lipids in photosynthesis and membrane lipid homeostasis in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2009. V. 150. P. 1147. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139758>
15. Horvath S.E., Daum G. Lipids of mitochondria // *Prog. Lipid Res.* 2013. V. 52. P. 590. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.07.002>
16. Pottosin I., Shabala S. Transport across chloroplast membranes: optimizing photosynthesis for adverse environmental conditions // *Mol. Plant.* 2016. V. 9. P. 356. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.10.006>
17. Tsydendambaev V.D., Ivanova T.V., Khalilova L.A., Kurkova E.B., Myasoedov N.A., Balnokin Yu.V. Fatty acid composition of lipids in vegetative organs of the halophyte *Suaeda altissima* under different levels of salinity // *Russ. J. Plant Physiol.* 2013. V. 60. P. 661. <https://doi.org/10.1134/S1021443713050142>
18. Мелихов В.В., Зибаров А.А., Мелихова Н.П., Романова А.В. Характер и направленность изменений климатических параметров Волгоградской обла-

- сти // Бюл. Нижневолж. Агроунивер. компл.: наука и высш. проф. обр. 2019. Т. 1. С. 60.
19. Методические указания по уничтожению органических веществ в природных, питьевых, сточных водах и пищевых продуктах в СВЧ-системе "МиNOTавр-2". Санкт-Петербург: Люмекс, 2005. 20 с.
20. *Lichtenthaler H.K.* Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // *Methods in enzymol.* 1987. V. 148. P. 350.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
21. *Rozentsvet O.A., Bogdanova E.S., Ivanova L.A., Ivanov L.A., Tabalenkova G.N., Zakhozhiy I.G., Nesterov V.N.* Structural and functional organisation of the photosynthetic apparatus in halophytes with different strategies of salt tolerance // *Photosynthetica.* 2016. V. 54. P. 405.
22. *Rozentsvet O., Nesterov V., Bogdanova E., Kosobryukhov A., Zubova S., Semenova G.* Structural and molecular strategy of photosynthetic apparatus organization of wild flora halophytes // *Plant Physiol. Biochem.* 2018. V. 129. P. 213.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.06.006>
23. *Лось Д.А.* Десатуразы жирных кислот. Москва: Научный мир, 2014. 361 с.
24. *Lundgren M.R., Osborne C.P., Christin P.-A.* Deconstructing Kranz anatomy to understand C₄ evolution // *J. Exp. Bot.* 2014. V. 65. P. 3357.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eru186>
25. *Edwards G.E., Franceschi V.R., Voznesenskaya E.V.* Single-cell C₄ photosynthesis versus the dual-cell (Kranz) paradigm // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004. V. 55. P. 173.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141725>
26. *Пьянков В.И., Вахрушева Д.В.* Пути первичной фиксации CO₂ у C₄-растений семейства маревых аридной зоны Средней Азии // *Физиология растений.* 1989. Т. 36. С. 228.
27. *Omoto E., Kawasaki M., Taniguchi M., Miyake H.* Salinity induces granal development in bundle sheath chloroplasts of NADP-malic enzyme type C₄ plants // *Plant Prod. Sci.* 2009. V. 12. P. 199.
<https://doi.org/10.1626/pp12.199>
28. *Michaud M., Prinz W.A., Jouhet J.* Glycerolipids synthesis and lipid trafficking in plant mitochondria // *FEBS J.* 2017. V. 284. P. 376.
<https://doi.org/10.1111/febs.13812>
29. *Jouhet J.* Importance of the hexagonal lipid phase in biological membrane organization // *Front. Plant. Sci.* 2013. V. 4. Art. 494. P. 1.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00494>

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АПОПЛАСТНЫХ ПЕРОКСИДАЗ ИЗ КОРНЕЙ ПШЕНИЦЫ С НИТРИТОМ И НИТРАТОМ: ИНТЕРМЕДИАТЫ И ПРОДУКТЫ

© 2022 г. Е. И. Галеева^{а, *}, Л. В. Викторова^а, О. П. Гурьянов^а,
А. А. Суханов^б, А. В. Часов^{а, с}, Ф. В. Минибаева^{а, с, **}

^аКазанский институт биохимии и биофизики — обособленное структурное подразделение
Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия

^бКазанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского — обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр
“Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия

^сКазанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

*e-mail: e.galeeva@kibb.knc.ru

**e-mail: minibayeva@kibb.knc.ru

Поступила в редакцию 15.04.2021 г.

После доработки 04.05.2021 г.

Принята к публикации 04.05.2021 г.

Пероксидазы широко распространены в животных и растительных тканях, где они выполняют разнообразные функции. Пероксидазы обладают широкой специфичностью к разнообразным по химическому строению субстратам. Наряду с перекисью водорода, фенольными соединениями и токсичными соединениями ароматической природы, субстратами пероксидаз являются азотсодержащие соединения. Настоящая работа посвящена изучению роли экстраклеточных пероксидаз пшеницы в метаболизме азотсодержащих соединений. Было показано, что частично очищенные изоферменты, различающиеся по пероксидазной активности, принимают участие в метаболизме азотсодержащих соединений. Продемонстрировано образование первичных и вторичных феноксильных радикалов при совместном окислении хлорогеновой кислоты, нитрита и H_2O_2 . При совместном окислении очищенными изоферментами *p*-кумаровой кислоты и нитрита выявлено образование 4-гидрокси-3-нитрокоричной кислоты. Мы предполагаем, что одни и те же изоформы могут участвовать как в окислении нитрита с образованием нитрофенола, так и в восстановлении нитрата. Участие растительных пероксидаз в метаболизме азота можно представить в виде совокупности реакций по восстановлению и/или окислению азота разной степени окисленности с образованием активных интермедиатов.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, апопластная пероксидаза, нитрит, нитрат, феноксильные радикалы

DOI: 10.31857/S0015330322010043

ВВЕДЕНИЕ

Пероксидаза (ПО) является ключевым ферментом окислительно-восстановительного метаболизма, вовлеченным как в генерацию, так и в утилизацию активных форм кислорода (АФК) [1, 2]. Известно, что ПО обладает широкой субстратной специфичностью к разнообразным по химическому строению субстратам. Наряду с перекисью водорода, фенольными соединениями и токсичными соединениями ароматической природы, субстратами ПО являются соединения азота различной степени окисленности — нитраты и нитриты [3–5].

Сокращения: АФК — активные формы кислорода, АФА — активные формы азота, ПО — пероксидаза, ЭКР — экстраклеточный раствор.

В растениях одним из ключевых процессов азотного метаболизма является восстановление нитратов, происходящее как в листьях, так и в корнях с участием ферментов нитратредуктазы и нитритредуктазы [6]. Наряду с этим, в метаболизм азотных соединений могут быть также вовлечены и оксидоредуктазы, в частности, пероксидазы [7]. Взаимодействие ПО с азотными соединениями может сопровождаться образованием заряженных побочных продуктов, обладающих неспаренным электроном, а поэтому являющихся реакционно-активными. Потенциально это взаимодействие может сопровождаться образованием активных форм азота (АФА), таких как радикал диоксида азота NO_2 , три- и тетроксиды диазота N_2O_3 , N_2O_4 , монооксид азота NO , пероксинитрит $ONOO^-$,

S-нитрозоглутатион GSNO, S-нитрозотиол SNO [7, 8]. Известно, что АФА играют важную роль в передаче сигнала в растениях и регулируют широкий спектр физиологических и биохимических реакций [9, 10]. В частности, NO принимает участие в регуляции клеточного цикла растительной клетки, процессов дифференциации и морфогенеза растений. Он вовлечен в трансдукцию сигналов, стимулирующих синтез фитогормонов [11]. К настоящему времени накоплены данные об участии NO в ответных реакциях растений на действие стрессоров [11, 12]. Кроме того, АФА окисляют и нитрируют нуклеиновые кислоты, белки и липиды [9].

До настоящего времени роль ПО в метаболизме азотных соединений слабо изучена. В клетках животных показано, что некоторые ПО участвуют в образовании АФА [8], кроме того, некоторые ПО животного и растительного происхождения могут использовать NO в качестве субстрата [13, 14]. Вовлечение отдельных изоформ ПО, изолированных из сельскохозяйственных растений, в том числе злаковых, в метаболизм азотных соединений не было показано. Именно сельскохозяйственные растения подвергаются значительному стрессу при внесении высоких доз азотных удобрений, что ведет к накоплению азотистых соединений и продуктов их метаболизма в растениях и, в конечном итоге, в организме животных и человека, потребляющих эти растения с пищей. В работе Huang с соавт. [15] показано, что коммерческий препарат ПО хрена катализирует образование NO из гидроксимочевин в присутствии H_2O_2 . Кроме того, трансгенные растения табака со сверхэкспрессией гена пероксидазы *swpa4* обладали повышенным уровнем NO [16]. В работе Sakihama с соавт. [5] продемонстрировано нитрование растительных фенолов с использованием коммерческого препарата ПО хрена. Реакция нитрования фенолов ПО хрена была подробно изучена в работе Kong с соавт. [17], проанализированы кинетические характеристики и предложен пинг-понг механизм двухсубстратной ферментативной реакции (механизм двойного замещения). Эти данные свидетельствуют о сложном характере взаимодействия растительных ПО, азотсодержащих соединений и фенольных субстратов ПО с образованием биологически-активных интермедиатов. В связи с этим, целью настоящего исследования была идентификация продуктов взаимодействия экстраклеточных ПО корней пшеницы с фенолами в присутствии азотных соединений. Для достижения этой цели в задачи исследования входили: 1) определение промежуточного продукта радикальной природы, образующегося в результате совместного ПО-опосредованного окисления фенолов и нитритов; 2) идентификация конечного продукта этой реакции.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект. Объектом исследования служили проростки яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Казанская юбилейная, выращенные на растворе 0.25 мМ $CaCl_2$ при 23°C, 12-часовом светопериоде и плотности потока энергии 100 Вт/м². Корни 5-дневных проростков немедленно после отсечения от проростков инфильтрировали Трис-НСl буфером (50 мМ рН 7.4) под давлением 80 кПа в течение 30 с. Буфер после инфильтрации (экстраклеточный раствор, ЭКР) использовали для выделения белков. Цитоплазматическое загрязнение ЭКР определяли по активности маркерного цитоплазматического белка глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49) [18]. Содержание белка измеряли методом Брэдфорд [19].

Очистка белков. Экстраклеточные белки осаждали $(NH_4)_2SO_4$ (30–80%) и центрифугировали при 23500 g в течение 20 мин. Образовавшийся осадок ресуспендировали в Трис-НСl буфере (50 мМ рН 7.4) и диализовали против Трис-НСl буфера (25 мМ рН 9.0) в течение ночи при 4°C.

Ионообменную хроматографию проводили на колонке (1.5 × 13 см) с ДЭАЭ-сефадексом А-50, уравновешенную Трис-НСl буфером (25 мМ рН 9.0). Связавшиеся белки элюировали в линейном градиенте концентрации NaCl (0–0.6 М) в том же буфере со скоростью 0.4 мл/мин. Объем фракций составлял 1 мл. Анализ гомогенности изоформ пероксидаз в каждой хроматографической фракции проводили методом электрофореза в неденатурирующих условиях, без добавления Na-ДДС и меркаптэтанола, в 12% ПААГ с последующим окрашиванием бензидином для визуализации пероксидазной активности (см. ниже). Молекулярную массу белков определяли с помощью маркеров молекулярной массы широкого диапазона (Bio-Rad, США) и окрашиванием гелей Кумаси G250. Для дальнейшего анализа образцы концентрировали методом ультрафильтрации на мембране Ultracel-10K (Merck Millipore, США).

Изоэлектрофокусирование белков проводили в ПААГ с использованием амфолинов рН 3.5–10 (LKB, Швеция). Для определения изоэлектрической точки белков использовали набор стандартов IEF-M1A (3.6–9.3) (Sigma, США).

Активность изоферментов пероксидазы в геле выявляли с помощью окрашивания 0.05 М раствором бензидина с 30 мМ H_2O_2 в ацетатном буфере (0.2 мМ, рН 5.2).

Определение активности ферментов. Активность ПО (КФ 1.11.1.7.) измеряли спектрофотометрически (Perkin Elmer, США) с использованием бензидина в качестве субстрата ($\epsilon_{390} = 34 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). Реакционная смесь общим объемом 3 мл состояла из ацетатного буфера (100 мМ, рН 5.3), 1 мМ H_2O_2 , 1 мМ бензидина и 0.5 мл образца. Определение

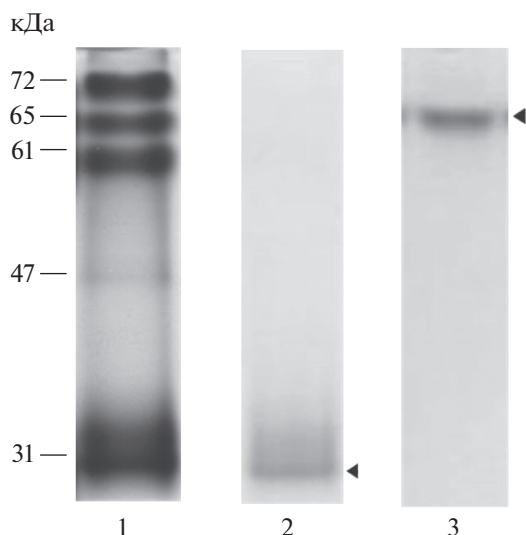


Рис. 1. Изоферментный спектр экстраклеточных ПО пшеницы: 1 – неочищенный экстракт, 2 – частично очищенная ПО1, 3 – частично очищенная ПО2.

активности пероксидаз по окислению *p*-кумаровой кислоты ($\epsilon_{285} = 17.787 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) проводили в следующих условиях: К-фосфатный буфер (35 mM, pH 7.4), 0.1 mM *p*-кумаровая кислота, 1 mM H_2O_2 и 0.05 мл образца, общий объем реакционной смеси составлял 0.5 мл. Нитратредуктазную активность ферментативной реакции – нитрита [20]. Реакционная смесь общим объемом 0.5 мл состояла из 30 mM Na-фосфатного буфера pH 8.0, 100 mM KNO_3 , 0.64 mM $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 0.64 mM диэтилдитиокарбамата натрия и 0.05 мл образца. Смесь инкубировали 20 мин при комнатной температуре, реакцию останавливали добавлением 0.05 мл ледяной уксусной кислоты, затем приливали 0.55 мл реактива Грисса и выдерживали в течение 20 мин. Количество образовавшегося продукта измеряли спектрофотометрически при 527 нм (Perkin Elmer, США).

В экспериментах по анализу ингибирования ферментативных реакций ингибиторы добавляли в инкубационную смесь перед добавлением фермента.

Определение феноксильного радикала. Детектирование феноксильного радикала осуществляли методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [21]. Реакционная смесь состояла из Трис-НСI буфера (20 mM, pH 7.4), 1 mM хлорогеновой кислоты, 5 mM H_2O_2 и 0.05 мл очищенного фермента. Эксперименты проводили в присутствии или в отсутствие 5 mM KNO_2 . Для улавливания короткоживущих первичных радикалов добавляли 0.1 мл 1 M ZnSO_4 [22]. Спектры ЭПР приготовленных образцов регистрировали на спектрометре X-диапазона EMX (Bruker, Германия) при комнатной температуре.

Идентификация нитрофенола. Анализ реакции нитрования *p*-кумаровой кислоты пероксидазами проводился по модифицированному протоколу Sakihama с сотр. [5]. Реакционная среда состояла из К-фосфатного буфера (25 mM, pH 7.4), 10 mM KNO_2 , 0.2 mM *p*-кумаровой кислоты, 1 mM H_2O_2 и 0.05 мл очищенного фермента. Контроль образования 4-гидрокси-3-нитрокоричной кислоты проводился спектрофотометрически (Perkin Elmer, США) по увеличению оптической плотности при 440 нм.

Идентификация продукта нитрования *p*-кумаровой кислоты пероксидазами проводилась с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ, Gilson, США). Реакционную смесь (К-фосфатный буфер (20 mM, pH 7.4), 100 mM KNO_2 , 2 mM *p*-кумаровая кислота, 10 mM H_2O_2) инкубировали с 0.1 мл очищенного фермента в течение 60 мин и центрифугировали при 5000 g в течение 5 мин. Полученный супернатант подвергали хроматографическому разделению с использованием колонки с обращенной фазой C-18 (Ultrasphere ODS, 4.6×250 мм, Beckman, США). Связавшееся вещество элюировали К-фосфатным буфером (50 mM, pH 7.0). Скорость элюирования составляла 0.5 мл/мин, объем вводимой пробы – 100 мкл. Выход веществ контролировали по поглощению при 314 и 440 нм с помощью диодно-матричного детектора (Shimadzu SPD-M20A, Япония). Хроматографический профиль продукта сравнивали с профилем стандарта. Стандарт 4-гидрокси-3-нитрокоричная кислота был синтезирован в виде желтых игольчатых кристаллов из 4-гидрокси-3-нитробензальдегида и малоновой (пропандионовой) кислоты по протоколу Freund [23]. Подтверждение структуры стандарта осуществляли методом ^1H -ЯМР (CD_3OD , 600 МГц, Bruker, Германия).

Опыты проводили в трех-пяти биологических повторностях, каждый вариант имел 3-кратную аналитическую повторность. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Microsoft Office Excel 2010. В таблицах приведены средние значения и их стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ЭКР корней пшеницы были обнаружены белки, обладающие пероксидазной (16.9 ммоль/мин на мг белка) и нитратвосстанавливающей (3.3 ммоль/мин на мг белка) активностями. Наличие лишь следовых количеств цитоплазматического загрязнения (<0.99%) говорит о присутствии в растворе лишь апопластных белков. Изоферментный спектр апопластных пероксидаз пшеницы был представлен пятью анионными и катионными изоформами с молекулярными массами от 31 до 72 кДа (рис. 1) и изоэлектрическими точками от 3.6 до 7.9 (данные не представлены). Частичная очистка с помощью осаждения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (30–80%) и

Таблица 1. Пероксидазная и нитратвосстанавливающая активности ПО1 и ПО2

Изоформы	Молекулярная масса, кДа	Пероксидазная активность		Нитратвосстанавливающая активность, ммоль/(мг белка мин)
		окисление бензидина ммоль/(мг белка мин)	окисление <i>p</i> -кумаровой кислоты, ммоль/(мг белка мин)	
ПО1	31	2.3 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.8 ± 0.1
ПО2	65	43.5 ± 1.7	3.6 ± 0.1	5.5 ± 0.3

Таблица 2. Ингибирование пероксидазной и нитратвосстанавливающей активностей ПО1 и ПО2 пшеницы

Ингибитор	Концентрация, мМ	Пероксидазная активность, % от контроля		Нитратвосстанавливающая активность, % от контроля	
		ПО1	ПО2	ПО1	ПО2
NaN ₃	0.1	85 ± 3	98 ± 2	3 ± 1	6 ± 1
NaN ₃	1	52 ± 4	48 ± 2	0	0
KCN	0.1	16 ± 4	1 ± 0	15 ± 2	2 ± 0
KCN	1	13 ± 3	0	3 ± 1	1 ± 0

Примечание: пероксидазная и нитратвосстанавливающая активности в контроле (100%) приведены в таблице 1.

ионно-обменной хроматографии выявила наличие двух основных изоформ ПО – ПО1 с молекулярной массой 31 кДа и *r*I 3.6 и ПО2 с молекулярной массой 65 кДа и *r*I 6.9 (рис. 1). Было обнаружено, что нейтральная изоформа ПО2 проявляла более высокую пероксидазную активность по окислению бензидина (в 19 раз) и естественного субстрата – *p*-кумаровой кислоты (в 24 раза), а также нитратвосстанавливающую активность (в 7 раз) по сравнению с ПО1 (табл. 1). И пероксидазная, и нитратвосстанавливающая активности ПО1 и ПО2 ингибировались NaN₃ и KCN. Азид более эффективно подавлял нитратвосстанавливающую активность ПО1 и ПО2, чем пероксидазную активность (табл. 2). Цианид эффективно ингибировал обе ферментативные реакции, причем в большей степени у ПО2, чем у ПО1.

Окисление фенольных субстратов ПО сопровождается образованием ряда промежуточных продуктов, в том числе феноксильных радикалов. Образование первичных и вторичных феноксильных радикалов с характерными спектрами ЭПР было выявлено при окислении частично очищенной ПО2 пшеницы естественного фенольного субстрата – хлорогеновой кислоты (рис. 2а). Аналогичные результаты были показаны с ПО1 (данные не представлены). Через несколько минут после начала реакции спектр ЭПР менялся, первичные радикалы преобразовывались во вторичные (рис. 2б). Динамика накопления вторичных радикалов в присутствии ПО свидетельствует о постепенном их накоплении, в то время как при добавлении нитрита образование вторичных радикалов происходило мгновенно (рис. 2в). В отсутствие H₂O₂

образования радикалов не происходило (данные не представлены).

Спектрофотометрический анализ продуктов реакции совместного окисления KNO₂ и *p*-кумаровой кислоты ПО2 корней пшеницы выявил образование нитропроизводного соединения. Повышение оптической плотности при 440 нм, по данным Sakihama с соавт. [5], свидетельствует об образовании 4-гидрокси-3-нитрокоричной кислоты (рис. 3). Аналогичные результаты получены для ПО1 (данные не показаны).

Хроматографический анализ продуктов реакции совместного окисления KNO₂ и *p*-кумаровой кислоты ПО2 корней пшеницы выявил образование нитропроизводного соединения (рис. 4). Без добавления KNO₂ (рис. 4) или в отсутствие ПО (данные не показаны) образования нитрофенола не происходило. Сравнение оптических спектров поглощения синтезированного стандарта 4-гидрокси-3-нитрокоричной кислоты и нитропроизводного продукта окисления ПО выявило идентичность формы спектров с характерными максимумами поглощения в области 314 и 440 нм при нейтральном pH (рис. 4а, б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Накопление азотсодержащих соединений и продуктов их метаболизма очень токсично для растений и животных. Наряду с нитрат- и нитритредуктазами, метаболизирующими эти соединения, оксидоредуктазы ПО также могут утилизировать азотсодержащие соединения, что приводит к образованию

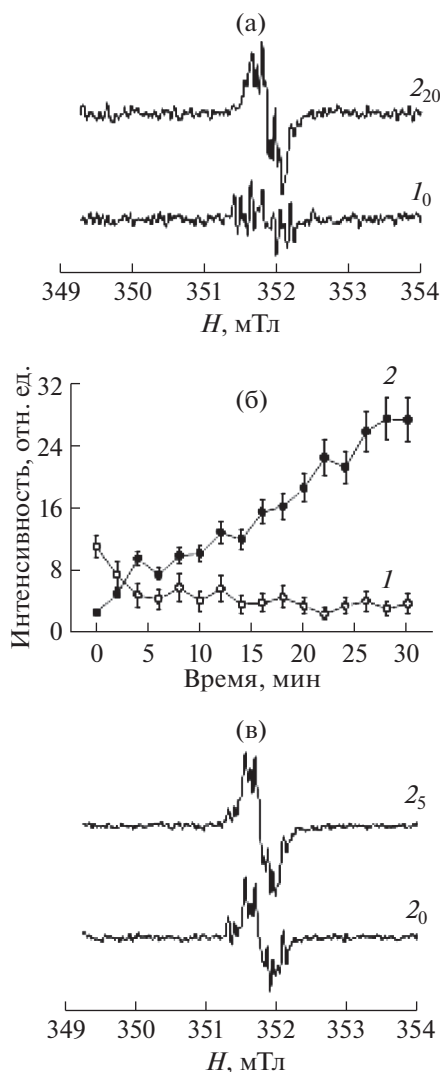


Рис. 2. Образование феноксильных радикалов при окислении хлорогеновой кислоты ПО2. (а) – при окислении хлорогеновой кислоты ПО2 без KNO_2 , (б) – динамика накопления вторичных радикалов без KNO_2 , (в) – при окислении хлорогеновой кислоты ПО2 при добавлении 5 мМ KNO_2 . 1 – первичный радикал ($g = 2.0044$), I_0 – 0 мин; 2 – вторичный радикал ($g = 2.00415$), $2_0, 2_5, 2_{20}$ – 0, 5, 20 мин, соответственно.

нитропроизводных фенольных соединений. В настоящей работе мы продемонстрировали, что апопластные ПО корней пшеницы могут участвовать в метаболизме азотсодержащих соединений, окисляя совместно нитриты и фенолы, в частности, с образованием 4-гидрокси-3-нитрокоричной кислоты, а также вероятно, путем восстановления нитратов до нитритов.

Как известно, окисление ПО фенольных субстратов сопровождается образованием ряда промежуточных продуктов, в том числе феноксильных радикалов, которые можно детектировать методом ЭПР [21, 24]. В настоящей работе обнаружено образование феноксильных радикалов апопластными

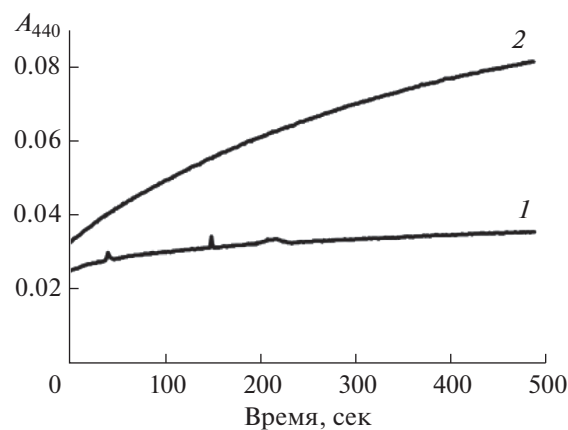


Рис. 3. Образование нитропроизводного соединения *p*-кумаровой кислоты ($\lambda = 440$ нм) при добавлении KNO_2 . 1 – без KNO_2 , 2 – с добавлением KNO_2 .

ПО пшеницы при использовании хлорогеновой кислоты в качестве фенольного субстрата (рис. 2). В ходе окисления хлорогеновой кислоты апопластной ПО первичные феноксильные радикалы постепенно преобразовывались в более стабильные вторичные радикалы. Ранее образование первичных и вторичных радикалов хлорогеновой кислоты было показано с использованием коммерческого препарата ПО хрена [21]. По данным Sakihama с сотр. [24], время полужизни первичных феноксильных радикалов составляет 45 с, время полужизни вторичных радикалов составляет уже 20 мин. Увеличение времени жизни феноксильных радикалов за счет взаимодействия с двухвалентными металлами приводит к проявлению проокислительных свойств радикалов, и, как следствие, перекисному окислению липидов и повреждению ДНК [24]. Наряду с этим, известно, что феноксильные радикалы могут проявлять антиоксидантные свойства, принимая участие в детоксикации H_2O_2 , гидроксильного радикала, синглетного кислорода, поскольку являются промежуточными продуктами при окислении фенолов пероксидазами [24]. В дальнейшем феноксильные радикалы либо восстанавливаются до фенола с помощью аскорбата или монодегидроаскорбат редуктазы [21], либо, при наличии нитритов и пероксидазы, нитрируются с образованием нитропроизводного [5]. В наших экспериментах добавление в реакционную смесь нитрита индуцировало мгновенное образование вторичных феноксильных радикалов даже в отсутствие ПО (рис. 2). Возможно, генерация вторичных феноксильных радикалов происходит неферментативным путем. Учитывая, что в отсутствие нитрита конверсия первичных радикалов и накопление вторичных радикалов происходит постепенно, можно полагать, что нитрит резко повышает токсичность действия феноксильных радикалов.

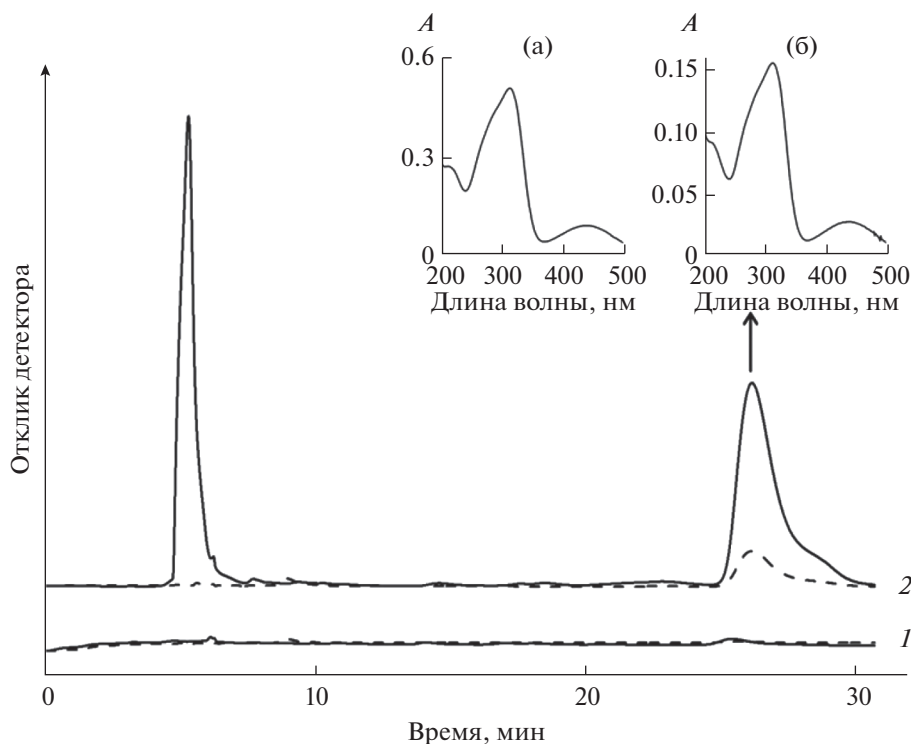


Рис. 4. Хроматографический анализ продуктов реакции окисления KNO_2 и *p*-кумаровой кислоты ПО2 пшеницы. Сплошная линия – 314 нм, прерывистая – 440 нм. 1 – контроль, 2 – KNO_2 . Во вставках показаны оптические спектры поглощения стандарта 4-гидрокси-3-нитрокоричной кислоты (а) и продукта окисления *p*-кумаровой кислоты (б).

Для ПО различного происхождения характерно одновременное окисление нескольких субстратов [25]. Финальным продуктом совместного превращения фенольных соединений и нитритов, происходящее через образование промежуточных феноксильных радикалов, являются нитропроизводные фенолов [5]. В нашей работе при совместном окислении очищенными ПО1 и ПО2 кумаровой кислоты и нитрита обнаружено образование 4-гидрокси-3-нитрокоричной кислоты (рис. 3). В отсутствие ПО появления этого нитропроизводного не наблюдается. Содержание нитрокоричной кислоты среди остальных продуктов реакции невелико (рис. 4), однако эта кислота имеет важное защитное значение. Например, известно, что присоединение нитрогруппы к тирозину, и в меньшей степени к триптофану, может приводить к изменению физико-химических свойств белков и их функций. Так, добавление нитрогруппы вызывает заметный сдвиг рКа гидроксильной группы с 10.07 в тирозине до 7.50 в 3-нитротирозине и повышает гидрофобность тирозина, что сказывается на активности белка. Присутствие 3-нитротирозина связывают с широким спектром заболеваний человека и животных [26]. В растениях нитрование тирозина вовлечено в разнообразные метаболические процессы, а также в ответные реакции на действие абиотических и биотических стрессоров [27, 28]. Оксикоричные кислоты близ-

ки по строению к тирозину, и их нитрование предотвращает нитрование аминокрупп белков [5]. Таким образом, образование нитрофенолов в результате совместного окисления фенолов и нитритов ПО может способствовать уменьшению нитрования белков.

Ранее нами было показано, что в листьях пшеницы при помещении растений в темноту происходило активирование ПО. Интересно, что при добавлении избытка нитрата значительного активирования ПО не наблюдалось [29]. Возможно, что снижение ПО активности по окислению фенолов в присутствии нитрата в темноте связано с взаимодействием нитрата с активным центром ПО. Известно, что нитрат ингибирует образование соединения E1 (промежуточной полуокисленной формы фермента), связываясь внутри гемового “кармана” ПО [30]. Ранее было высказано предположение об участии ПО в восстановлении нитратов. Так, Пейве с соавт. [3] обнаружили нитратвосстанавливающую активность ПО во всех органах кормовых бобов, с более высоким уровнем в корнях. В наших экспериментах экстраклеточные ПО корней пшеницы также проявляли нитратвосстанавливающую активность с образованием нитрита. Интересно, что нитратвосстанавливающая активность ПО корней была более чувствительна к ингибитору гемсодержащих ферментов азиду, чем фенолоксидазная активность

ПО (табл. 2). Аналогичные результаты с использованием коммерческого препарата ПО хрена были получены Иванова с соавт. [20]. Чувствительность к цианиду обеих активностей ПО пшеницы в наших экспериментах была одинакова (табл. 2). Можно полагать, что, несмотря на то, что основным нитратвосстанавливающим ферментом в клетках растений является нитратредуктаза, в определенных условиях, например, при избыточном обеспечении растений нитратами или других стрессах, конкурентные взаимоотношения H_2O_2 и нитрата приводят к “включению” нитратвосстанавливающей активности ПО.

Таким образом, участие ПО в метаболизме азота можно представить в виде совокупности реакций по восстановлению и окислению азота разной степени окисленности. Поступившие в корни нитраты в определенных условиях могут с помощью ПО корневой метаболизироваться в нитриты, которые впоследствии могут быстро восстанавливаться нитритредуктазой до аммиака или посредством ПО включаться в состав нитропроизводных фенольных соединений. Кроме того, как показано данными ЭПР, ПО корней участвует в образовании первичных и вторичных феноксильных радикалов, которые являются интермедиатами образования нитрофенолов. В настоящей работе нами впервые показано участие одних и тех же изоформ ПО корней пшеницы как в возможном восстановлении нитрата, так и в окислении нитрита с образованием нитрофенола. Имеющиеся в настоящий момент данные свидетельствуют о том, что ПО могут регулировать концентрацию АФА. В частности, не исключено, что ПО-опосредованный метаболизм азота в растениях сопровождается образованием АФА, обладающих большим регуляторным действием. Будущие исследования прольют свет на вовлечение и физиологические роли растительных ПО в образовании и метаболизме АФА, таких как NO_2 и NO , как побочных продуктов совместного окисления азотсодержащих соединений и фенолов.

Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук” (анализ активности ферментов) с использованием оборудования Коллективного спектро-аналитического Центра физико-химических исследований строения, состава и свойств веществ и материалов Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук” и частично в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (получение химического стандарта).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит ка-

ких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bolwell G.P., Bindschedler L.V., Blee K.A., Butt V.S., Davies D.R., Gardner S.L., Gerrish C., Minibayeva F.* The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system // *J. Exp. Bot.* 2002. V. 53. P. 1367.
2. *Francoz E., Ranocha P., Nguyen-Kim H., Jamet E., Burlat V., Dunand C.* Roles of cell wall peroxidases in plant development // *Phytochemistry*. 2015. V. 112. P. 15. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.07.020>
3. *Пейве Я.В., Иванова Н.Н., Овчаренко Г.А., Ширинская М.Г.* О возможном участии пероксидазы в восстановлении нитратов в растениях // *Физиология растений*. 1975. Т. 22. С. 527.
4. *Hewitt E.J.* Assimilatory nitrate-nitrite reduction // *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1975. V. 26. P. 73.
5. *Sakihama Y., Tamaki R., Shimoji H., Ichiba T., Fukushi Y., Tahara S., Yamasaki H.* Enzymatic nitration of phytophenolics: evidence for peroxyxynitrite-independent nitration of plant secondary metabolites // *FEBS Lett.* 2003. V. 553. P. 377. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)01059-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)01059-7)
6. *Campbell W.H.* Structure and function of eukaryotic NAD(P)H:nitrate reductase // *Cell Mol. Life Sci.* 2001. V. 58. P. 194. <https://doi.org/10.1007/PL00000847>
7. *Van Der Vliet A., Eiserich J.P., Halliwell B., Cross C.E.* Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite: a potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 7617. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.12.7617>
8. *Palmerini C.A., Marmottini F., Arienti G.* Production of nitric oxide by human salivary peroxidase and by bovine lactoperoxidase // *J. Biochem. Mol. Toxic.* 2012. V. 26. P. 87. <https://doi.org/10.1002/jbt.21407>
9. *Adams L., Franco M.C., Estevez A.G.* Reactive nitrogen species in cellular signaling // *Exp. Biol. Med.* 2015. V. 240. P. 711. <https://doi.org/10.1177/1535370215581314>
10. *Corpas F.J., del Río L.A., Palma J.M.* Impact of nitric oxide (NO) on the ROS metabolism of peroxisomes // *Plants*. 2019. V. 8. P. 37. <https://doi.org/10.3390/plants8020037>
11. *Domingos P., Prado A.M., Wong A., Gehring C., Feijo J.A.* Nitric oxide: a multitasked signaling gas in plants // *Mol. Plant*. 2015. V. 8. P. 506. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.010>
12. *Santisree P., Bhatnagar-Mathur P., Sharma K.K.* NO to drought-multifunctional role of nitric oxide in plant drought: do we have all the answers? // *Plant Sci.* 2015. V. 239. P. 44. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.07.012>
13. *Abu-Soud H.M., Hazen S.L.* Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 37524. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.48.37524>

14. *Pintusa F., Spanò D., Bellelli A., Angelucci F., Forteb E., Meddaa R., Florisa G.* Nitric oxide, substrate of *Euphorbia characias* peroxidase, switches off the CN- inhibitory effect // FEBS Open Bio. 2012. V. 2. P. 305. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2012.09.004>
15. *Huang J., Sommers E.M., Shapiro D.B.K., King S.B.* Horseradish peroxidase catalyzed nitric oxide formation from hydroxyurea // J. Am. Chem. Soc. 2002. V. 124. P. 3473. <https://doi.org/10.1021/ja012271v>
16. *Kim Y.-H., Park S.C., Yun B.-W., Kwak S.-S.* Overexpressing sweetpotato peroxidase gene *swpa4* affects nitric oxide production by activating the expression of reactive oxygen species- and nitric oxide-related genes in tobacco // Plant Physiol. Biochem. 2017. V. 120. P. 52. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.09.023>
17. *Kong M., Zhang Y., Li Q., Dong R., Gao H.J.* Peroxidase-catalyzed nitration of phenol in a biphasic system // Microbiol. Biotechnol. 2017. V. 27. P. 297. <https://doi.org/10.4014/jmb.1607.07039>
18. *Кочетов Г.А.* Практическое руководство по энзимологии. М.: Высшая школа, 1980. 272 с.
19. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248.
20. *Ivanova N.N., Peive Ya.V.* Nitrate reduction by higher plant peroxidase // FEBS Lett. 1973. V. 31. P. 229.
21. *Yamasaki H., Grace S.C.* EPR detection of phytophenoxyl radicals stabilized by zinc ions: evidence for the redox coupling of plant phenolics with ascorbate in the H₂O₂-peroxidase system // FEBS Lett. 1998. V. 422. P. 377.
22. *Kalyanaraman B., Felix C.C., Sealy R.C.S.* Electron spin resonance-spin stabilization of semiquinones produced during oxidation of epinephrine and its analogues // J. Biol. Chem. 1983. V. 259. P. 354.
23. *Freund W.* A new synthesis of arsonic acids. Part II. Coupling of $\alpha\beta$ -unsaturated carbonyl compounds with diazotised arsanilic acid and 4-amino-2-nitrophenylarsonic acid // J. Chem. Soc. 1952. V. 588. P. 3072.
24. *Sakihama Y., Cohen M.F., Grace S.C., Yamasaki H.* Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants // Toxicology. 2002. V. 177. P. 67. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(02\)00196-8](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(02)00196-8)
25. *Хушнұльян Д.М., Фечина В.А., Казаков С.В., Сахаров И.Ю., Газарян И.Г.* Неферментативное взаимодействие продуктов реакции и субстратов в катализе пероксидазой // Биохимия. 2003. Т. 68. С. 1231.
26. *Abello N., Kerstjens, H.A.M., Postma D.S., Bischoff R.* Protein tyrosine nitration: selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated // J. Proteome Res. 2009. V. 8. P. 3222. <https://doi.org/10.1021/pr900039c>
27. *Saito S., Yamamoto-Katou A., Yoshioka H., Doke N., Kawakita K.* Peroxynitrite generation and tyrosine nitration in defense responses in tobacco BY-2 cells // Plant Cell Physiol. 2006. V. 47. P. 689. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcj038>
28. *Minibayeva F., Beckett R.P.* The roles of plant peroxidases in the metabolism of reactive nitrogen species and other nitrogenous compounds // Reactive Oxygen and Nitrogen Species Signaling and Communication in Plants, Signaling and Communication in Plants / Eds. Gupta K.J., Igamberdiev A.U. Switzerland: Springer International Publishing. 2015. P. 43.
29. *Галеева Е.И., Трифонова Т.В., Пономарева А.А., Викторова Л.В., Минабаева Ф.В.* Нитратредуктаза листьев *Triticum aestivum*: регуляция активности и возможная роль в образовании оксида азота // Биохимия. 2012. Т. 77. С. 512.
30. *Araiso T., Dunford H.B.* Horseradish peroxidase. XLI. Complex formation with nitrate and its effect upon compound I formation // Biochem. Biophys. Res. Co. 1980. V. 94. P. 1177.

УДК 581.1

**МУТАЦИЯ ГЕНА *ARA7/AtRabF2b*, УВЕЛИЧИВАЮЩАЯ
СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКА *ARA7*, ВОВЛЕЧЕННОГО В РЕГУЛЯЦИЮ
ЭНДОЦИТОЗА, ПОВЫШАЕТ СОЛЕУСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ
Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.¹**

© 2022 г. О. В. Сергиенко^а, Л. А. Халилова^а, Ю. В. Орлова^а, А. В. Шувалов^а,
Н. А. Мясоедов^а, И. В. Карпычев^{а, *}

^аИнститут физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: ikarpichev@gmail.com

Поступила в редакцию 10.02.2021 г.

После доработки 30.04.2021 г.

Принята к публикации 30.04.2021 г.

С помощью инсерционного мутанта по гену *ARA7/AtRabF* (AT4G19640) с повышенной экспрессией кодируемого им белка – малой ГТФазы Rab5, являющейся одним из ключевых регуляторов везикулярного транспорта, исследовали связь эндоцитоза с ионным гомеостатированием и солеустойчивостью у *Arabidopsis thaliana*. У мутантного аллеля было выявлено наличие делеции из 14 нуклеотидов в 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) и отсутствие первых трех нуклеотидов на 5'-конце мРНК. Хотя эти изменения и несколько уменьшили относительный уровень транскриптов данного гена в листьях мутантных растений при нормальных условиях, при этом в листьях наблюдалось повышенное содержание соответствующего белка *ARA7*. Это в свою очередь вызвало заметные фенотипические изменения у растений, выращенных на питательных средах с NaCl. Электронно-микроскопические исследования выявили у мутанта изменения в ультраструктуре клеток корней. Наиболее заметные отличия мутантных растений от дикого типа (ДТ) состояли в наличии электронно-плотных отложений на тонопласте, повышенной вакуолизации и везикуляции цитозоля, увеличенном содержании сливающихся друг с другом микровакуолей, а также в увеличенном содержании мультивезикулярных тел и аутофагических структур, что указывает на изменение пути эндоцитоза и динамики формирования вакуоли. На уровне целого растения фенотип данного мутанта выражался в позитивной реакции на длительный солевой стресс по сравнению с растениями дикого типа. Мутантные растения имели приторный по массе корней и листьев, повышенное содержание K^+ и сниженное среднее содержание Na^+ в органах, указывая в целом на более высокую солеустойчивость мутанта по сравнению с растениями ДТ. Предполагается, что вызванные мутацией изменения ультраструктуры отражают пертурбации в везикулярном транспорте и аутофагии, результатом которых являются изменения в ионном гомеостатировании и солеустойчивости растений.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, солевой стресс, малая ГТФаза, *ARA7/AtRabF2b*, мутация, сверхэкспрессия, везикулярный транспорт, рост, ионный гомеостаз, ультраструктура

DOI: 10.31857/S0015330322010195

ВВЕДЕНИЕ

Везикулярный транспорт (ВТ) играет важную роль в распределении (sorting) и доставке веществ в различные локусы клетки и за ее пределы. Существует два основных пути ВТ: (1) экзоцитоз, или секреторный путь, посредством которого белки, липиды и другие молекулы, синтезированные в цитоплазме, транспортируются через эндоплазматический ретикулум (ЭР), аппарат Гольджи (АГ) и транс-Гольджи сеть/ранние эндосомы (ТГС/РЭ)

к плазмалемме (ПМ) или в экстрацеллюлярное пространство, а также в вакуоль и другие органеллы клетки, и (2) эндоцитоз, осуществляющий интернализацию находящихся в ПМ белков и липидов, а также поглощение молекул из экстрацеллюлярного пространства. Главной ветвью эндоцитозного пути является транспорт в вакуоли [1].

Ключевую роль в регуляции сортировки, связывания везикул с мембранами-мишенями и их последующего слияния, играют RAB ГТФазы и комплексы SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors), осуществляющие слияние транспортируемых везикул с мембранами-мишенями. Каждый транспортный

¹ К статье имеются дополнительные материалы, доступные для авторизованных пользователей по doi: 10.31857/S0015330322010195.

путь в клетке характеризуется специфическим набором молекул Rab ГТФаз и SNARE [2]. Регуляторные белки изменяют соотношение между ГТФ- и ГДФ-связывающими формами Rab5, изменяя этим направление и активность ВТ [3, 4]. Из 57 представителей Rab *A. thaliana*, три белка принадлежат семейству Rab5 ГТФаз. Два из них, консервативные среди эукариот белки *ARA7/AtRabF2b* и *RHA1/AtRabF2a*, и белок, специфический для наземных растений *ARA6/AtRabF1*, локализованы на разных популяциях эндосом с частичным перекрытием [2, 5]. *ARA7* и *RHA1* функционируют на поздних стадиях эндоцитозного пути, а именно на стадии слияния мультивезикулярных тел/поздних эндосом (МВТ/ПЭ) с вакуолью [6, 7]. Ингибирование поздних стадий эндоцитоза приводит к нарушению ВТ на всем пути от ПМ к вакуоли [8]. *ARA6*, в отличие от *ARA7* и *RHA1*, регулирует транспорт веществ на пути от ТГС к ПМ [2, 5, 9].

Ряд исследований указывает на вовлечение ВТ в механизмы ионного гомеостатирования и солеустойчивости растений, хотя имеющиеся в этой области сведения ограничены и противоречивы [10–15]. Например, нокаут-мутация по гену *ARA6* (AT3G54840) вызывала у *A. thaliana* сверхчувствительность к NaCl, а сверхэкспрессия мутантного гена *ARA6*^{O93L}, фиксирующего *ARA6* в ГТФ-связанной форме, повышала их солеустойчивость, что указывает на регуляторную функцию *ARA6* при ответе растений на засоление [10]. Сверхэкспрессия гена *AtRabG3e* (*AtRab7*, AT1G49300) активировала эндоцитоз в клетках *A. thaliana*, приводила к накоплению натрия в вакуолях и увеличению его содержания в побегах. Трансгенные растения по сравнению с диким типом обнаружили более высокую устойчивость к NaCl [11].

В настоящей работе мы сосредоточили внимание на Rab5 ГТФазе *AtARA7*, являющейся одним из ключевых регуляторов везикулярного транспорта. С помощью инсерционного мутанта по гену *AtARA7*, с повышенным содержанием кодируемого им белка, мы исследовали связь эндоцитоза с ионным гомеостатированием и солеустойчивостью *A. thaliana*. С этой целью данная мутация была охарактеризована и определен фенотип мутантных растений. Характеристика мутации включала определение точного положения вставки Т-ДНК в последовательности мутантной аллели гена *ARA7*, выявление изменений в первичной последовательности ДНК в соседних со вставкой областях, произошедших в процессе интеграции, а также влияния данных хромосомных перестроек на относительный уровень транскриптов гена *AtARA7* и количество соответствующего белка, а также относительный уровень транскриптов соседнего с ним гена *TRAM* (AT4G19645), относящегося к семейству белков, содержащих липид-сенсорный домен. Для определения фенотипа мутанта изучали

рост, содержание Na⁺ и K⁺ в органах, ультраструктуру клеток корня у мутантных растений и растений ДТ, выращенных в условиях водной культуры при наличии или отсутствии NaCl в питательном растворе (ПР).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал и выращивание растений. Работу выполняли на растениях *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (экотип Col-0) (ДТ) и его инсерционным мутанте по гену *AtARA7* (SALK_090266C) (<http://signal.salk.edu/index.html>). Все эксперименты, за исключением исследования ультраструктуры клеток, проводили на растениях, выращенных в условиях водной культуры. Семена проращивали на агаризованной среде, приготовленной на модифицированном питательном растворе (ПР) 1/2 Гибо [16], при температуре 23 ± 2°С, относительной влажности воздуха 70 ± 5%, фотопериоде 16/8 ч (день/ночь) и интенсивности света 80 мкмоль квантов/(м² · с), полученного от люминесцентных ламп ЛБ-80. Проростки 14-дневного возраста переносили на жидкий ПР 1/2 Гибо, который барботировали воздухом. Остальные условия выращивания растений на жидком ПР были такими же, как при проращивании семян. В вариантах с засолением через 3 сут после перенесения растений на жидкие ПР в них начинали вносить NaCl. Концентрацию соли увеличивали постепенно на 25 мМ в сутки до конечных концентраций 50 или 100 мМ. Смену ПР осуществляли еженедельно. Измерения проводили на растениях 45-дневного возраста. Для исследования ультраструктуры клеток корня использовали 4-дневные проростки, выращенные согласно [17] на агаризованной питательной среде 1/2 Мурасиге-Скуга (МС-среда), дополнительно содержащей 1% сахарозу, с добавлением или без добавления 100 мМ NaCl. Температурный и световой режимы были такими же, как для водной культуры.

Выделение ДНК и определение гомозиготности растений по гену *ARA7*. Геномную ДНК выделяли из листьев методом, приведенным на сайте (http://www.monsanto.com/products/documents/dna-detection/dna_im.pdf). Полученную ДНК использовали в качестве матрицы для определения гомозиготности растений методом ПЦР и для амплификации необходимых фрагментов. Последовательности использованных нами праймеров приведены в Дополнительных материалах (таблица 1). Амплифицированные фрагменты при необходимости секвенировали в компании Евроген. Для определения гомозиготности растений *A. thaliana* были выбраны праймеры LBa1, Ara7F и Ara7R. Пара праймеров, LBa1 и Ara7F, использовалась для амплификации фрагмента размером 1080 п.о. из мутантного аллеля SALK_090266C гена *ARA7*, в то время как пару, Ara7F и Ara7R, использовали

для амплификации фрагмента размером 1180 п.о. из аллеля ДТ того же гена. Продукты амплификации разделяли в 1% неденатурирующем агарозном геле, содержащем 0.5 мкг/мл бромистого этидия.

Определение наличия возможных дополнительных вставок Т-ДНК в геноме *ara7* мутантных растений методом инвертированной ПЦР. Две пары праймеров (LBa1 и M13F; LBb1 и M13F) и геномную ДНК растений гомозиготных генотипов (ДТ и *ara7*) использовали для определения местоположения Т-ДНК-вставки и возможного наличия дополнительных вставок методом инвертированной ПЦР (inverse PCR). Заметим, что Т-ДНК-вставка из вектора pROK2, использованного для инсерционного мутагенеза, содержит полилинкер и последовательность праймера M13F, расположенную непосредственно перед ним. Данный полилинкер находится на расстоянии около 650 п.о. от конца левой пограничной области Т-ДНК, что позволяет использовать вышеупомянутые пары праймеров и различные рестрикционные эндонуклеазы, сайты которых присутствуют в полилинкере, для постановки инвертированной ПЦР после лигирования. Пять мкг геномной ДНК обрабатывали 50 ед. рестрикционной эндонуклеазы BamHI в объеме 75 мкл в течение двух суток, после инактивации эндонуклеазы (экстракция смесью фенол/хлороформ с последующим двукратным переосаждением этиловым спиртом) лигировали с помощью T4 ДНК-лигазы (1 ед. Вейса) (Takara, США) в объеме 100 мкл в течение ночи при комнатной температуре. После экстракции смесью фенол/хлороформ с последующим двукратным переосаждением этиловым спиртом осадок ДНК растворяли в 25 мкл деионизированной воды. Для ПЦР (25 мкл) с Taq-полимеразой (Евроген, Россия) брали 2 мкл лигированной ДНК. Параметры программы амплификации: 94°C – 3 мин, затем 35 циклов: 94°C – 1 мин, 58°C – 1 мин, 72°C – 3 мин, и затем 72°C в течение 10 мин. Продукты амплификации разделяли в 1% неденатурирующем агарозном геле, выделяли из геля с помощью набора Clean up Mini (Евроген, Россия) и секвенировали в той же компании для определения геномной последовательности, прилегающей к Т-ДНК-вставке.

Выделение тотальной РНК из *A. thaliana* и синтез первой цепи кДНК. Для экстракции тотальной РНК из корней и листьев использовали методику, приведенную в работе [18]. РНК выделяли из листьев и корней растений 45-дневного возраста, выращенных в водной культуре, как описано в разделе “Растительный материал и выращивание растений”. Образцы (400 мг) отбирали из трех “средних” смесей, каждая из которых состояла из мелко порезанных листьев или корней 20 индивидуальных растений. После выделения для дополнительной очистки от примесей фенола РНК

переосаждали тремя объемами этанола, предварительно внося в раствор РНК 1/10 объема 3М ацетата натрия (рН 5.9). Для проверки целостности препараты РНК анализировали методом электрофореза в 1% неденатурирующем агарозном геле, содержащем бромистый этидий. Примеси геномной ДНК в выделенных препаратах РНК удаляли при помощи ДНКазы I (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией изготовителя. Синтез первой цепи кДНК осуществляли с использованием набора MMLV RTkit (Евроген, Россия) в соответствии с рекомендацией производителя.

Определение старта транскрипции мРНК гена *ARA7*. Для амплификации 5'-фрагмента мРНК гена *ARA7* использовали метод Step-Out RACE с набором праймеров Mint RACE primer set (Евроген, Россия) и ген-специфичным праймером Ara7F. Полученные ПЦР-продукты клонировали в T-A вектор pAL2-T (Евроген, Россия) и секвенировали в компании Евроген.

Количественная ПЦР в реальном времени на матрице кДНК (кОТ-ПЦР). кОТ-ПЦР использовали для анализа экспрессии генов *ARA7* и *TRAM* в мутантных растениях и растениях ДТ. Праймеры подбирали с использованием программы Light Cycler Probe Design 2.0 (Roche, США) предпочтительно в 1/3 кодирующей части мРНК, прилегающей к 3'-нетранслируемой области (3'-НТР). Последовательности генов были взяты из базы данных (<http://www.arabidopsis.org>). Размер ампликона при использовании выбранной пары (Ara71F и Ara71R) для гена *ARA7* составлял 105 п.о., а для гена *TRAM* (при использовании пары праймеров – TR1 и TRAM_R) – 144 п.о. В качестве референсного гена использовали *ACT2* (NM_001338358.1), последовательности праймеров к которому были опубликованы ранее [19]. Программа для амплификации была создана в соответствии с рекомендациями производителя прибора АНК-32 (Синтол, Россия) и инструкции к набору Готовая Смесь для ПЦР qPCRMix-HS SYBRmix (Евроген, Россия); тот же набор использовали для приготовления реакционного коктейля. В образец вносили 30 нг матрицы (исходя из количества РНК, взятой для синтеза кДНК). Относительный уровень представленности транскрипта (R) определяли с помощью программы Microsoft Excel по формуле:

$$R = C_0(ARA7)/C_0(ACT2) = 2^{N_t(ARA7) - N_t(ACT2)}, \quad (1)$$

где C_0 – начальная концентрация транскрипта, N_t – пороговый цикл.

Содержание Na^+ и K^+ в органах. Высушенные при 90°C органы 45-дневных растений измельчали. Ионы извлекали водной экстракцией при 100°C, экстракт фильтровали. Концентрацию Na^+ и K^+ в фильтратах определяли с помощью пламенного фотометра ФПА-2-01 (ОАО ЗОМЗ, Россия).

Электронная микроскопия. Ультраструктуру клеток изучали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Образцы подготавливали в соответствии со стандартной методикой, как описано ранее [20]. Срезы на сетках контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе LIBRA 120 (Германия). Площади органелл на срезах измеряли с помощью программы ZEN-2012 Microsoft, используя инструмент “контур”.

Статистический анализ. Статистическую обработку проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа, используя Microsoft Excel 2007. Данные представлены как средние значения и их стандартные ошибки. Достоверность различий между мутантами и растениями ДТ оценивали при разных значениях вероятности: $P \leq 0.05$ (*), $P \leq 0.01$ (**), $P \leq 0.001$ (***)

Продукция антител против AtARA7. Кроличьи поликлональные антитела к белку AtARA7 были получены компанией PhytoAbInc (Рэдвуд Сити, Калифорния, США). Синтетический пептид Leu185-Val194 (LPDRAMDRAV) из AtARA7, имеющий уникальную последовательность среди всех других последовательностей белков семейства Rab5 резуховидки Таля, был использован для иммунизации двух кроликов. Титр полученных иммунных сывороток был определен нами с использованием в качестве положительного контроля экспрессированного в *E. coli* полноразмерного белка AtARA7, который также содержал дополнительную С-концевую последовательность $6 \times \text{His}$. Данный химерный белок был получен путем амплификации открытой рамки считывания (ОРС) AtARA7 с помощью пары праймеров, ARA7NCOIp28aF и ARA7NCOIp28aR, на матрице кДНК *A. thaliana*, клонирования полученного продукта амплификации в вектор pET-28a(+) (Novagen, США) по сайтам BamHI и NcoI и последующей экспрессии рекомбинантного atARA7- $6 \times \text{His}$ в штамме *E. coli* BL-21 (pLysS) (Novagen, США). Наличие анти-AtARA7 антител в сыворотках было определено путем сравнения молекулярных масс белка в лизате штамма-производителя BL-21 (pLysS)-atARA7- $6 \times \text{His}$, реагирующего как с анти- $6 \times \text{His}$ антителами, так и с иммунными сыворотками, методом Вестерн-блот анализа. После этого анти-AtARA7 антитела из сыворотки с большими титром и авидностью были аффинно очищены на фирме Phyto Ab. После определения нами титра аффинно очищенных антител, они были использованы для Вестерн-блот анализа препаратов белков *A. thaliana* на присутствие AtARA7.

Иммуноблоттинг. Растительные клеточные лизаты готовили с использованием буфера E (125 мМ Трис-HCl, pH 8.8; 1% (w/v) SDS; 10% (v/v) глицерина; 50 мМ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$). После завершения электрофореза в 13% SDS-PAGE белки переносили на

нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0.45 мкм (Schleicher and Schuell, Германия) с помощью прибора для полусухого переноса Semy-Dry в соответствии с инструкцией изготовителя (Хеликон, Россия) и затем окрашивали с помощью красителя Ponceau S. Для детекции atARA7 кроличьи поликлональные аффинно очищенные антитела (1 мг/мл) к белку atARA7 использовали в разведении 1 : 1000 в растворе TBS-Tw-BSA (1 \times TBS, 0.2% Tween 20, 1% Бычий Сывороточный Альбумин (BSA), 0.01% NaN_3), а вторичные антитела (анти-кроличьи козы Ab, конъюгат с пероксидазой хрена (HRP) (Imtek, Россия)) в разведении 1 : 2500 в растворе TBS-Tween 20-DM (1 \times TBS, 0.2% Tween 20, 5% Carnation non-fat dry milk (Nestle, США)). После последовательной обработки первичными, а затем вторичными антителами, мембрану отмывали и проводили детекцию с использованием ECL (GEHealthcare, США). Для визуализации результатов иммуноблоттинга использовали систему гель-документации Chemi Doc XRS + System (BioRad, США). Количественный анализ содержания белка ARA7 осуществляли с использованием программы ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Для данного анализа на блоте для каждой дорожки выбирали область, содержащую обе близкие полосы ARA7 и пространство между ними.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика инсерционного мутанта *ara7* (*OEARA7*). Согласно данным сайта TAIR (www.arabidopsis.org) левая граница вставки Т-ДНК в последовательности гена *ARA7* в инсерционном мутанте (SALK_090266C) (<http://signal.salk.edu/index.html>) располагается в 5'-НТО первого экзона. Для определения точной локализации вставки в протомере мы амплифицировали и секвенировали фрагмент ДНК из генома гомозиготных мутантных растений с использованием пары праймеров – LBa1 и Ara7F (рис. 1а). Оказалось, что левая граница вставки прилегает к четвертому нуклеотиду вниз от старта транскрипции, который был определен для аллеля гена *ARA7* ДТ. Далее ниже вставки находится участок, соответствующий нуклеотидам +4...+15 от старта транскрипции. Сразу за нуклеотидом +15 следует нуклеотид +30, дальнейшая секвенированная последовательность полностью идентична приведенной в базе данных TAIR для ДТ. Таким образом, 5'-НТО мутантного аллеля гена *ARA7* содержит делецию из 14 нуклеотидов (рис. 1б).

Мы предположили, что наличие вставки Т-ДНК в промоторе *ARA7* может изменить место старта транскрипции данного гена. Для определения точного местоположения старта транскрипции в инсерционном мутанте амплифицированные 5'-фрагменты РНК клонировали в Т-А вектор и секвенировали. Оказалось, что мутантная мРНК

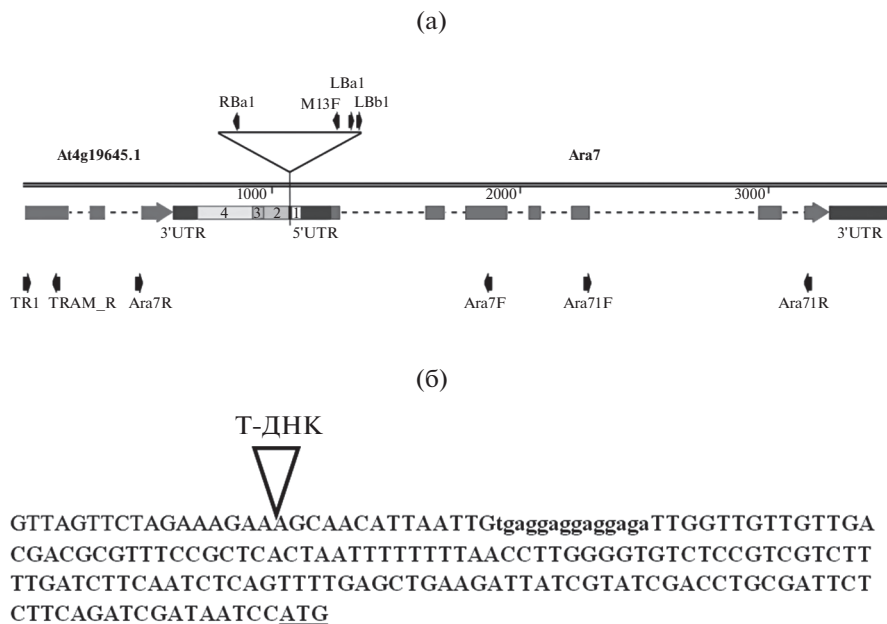


Рис. 1. Структура мутантного гена *OEARA7* и соседнего с ним гена *At4g19645.1 (TRAM)* *A. thaliana*. (а) — схема расположения функциональных элементов мутантного аллеля (*SALK_090266C*) гена *ARA7* и гена *At4g19645.1 (TRAM)*. Прямоугольниками обозначены экзоны (последние экзоны показаны прямоугольниками со стрелкой), нетранслируемые области и межгенный спейсер. Прерывистой линией обозначены последовательности интронов. Стрелками ниже показаны положения праймеров, использованных в данном исследовании. 1 — делеция, которая располагается в положении от +16 до +29 нуклеотида в 5'-НТО; 2 — фрагмент ДНК неизвестной природы; 3 — последовательность, идентичная началу 5'-НТО *ARA7*; 4 — последовательность межгенного спейсера; (б) — скорректированная последовательность промотора мутантного аллеля (*SALK_090266C*) гена *ARA7*. Полужирным шрифтом выделена последовательность первого экзона согласно данным TAIR. Стрелкой указано место вставки Т-ДНК. Строчными буквами обозначена делеция (от +16 до +29 нуклеотида вниз от старта транскрипции). Последовательность иницирующего кодона подчеркнута.

не содержит первых трех нуклеотидов на 5'-конце, которые присутствуют в ДТ. Также мы обнаружили в мутантной мРНК отсутствие нуклеотидов +16...+29, показанное нами на уровне геномной ДНК (см. выше).

Мы также определили относительную представленность транскриптов аллелей *ARA7* в гомозиготных мутантных растениях и в растениях ДТ методом КОТ-ПЦР. Оказалось, что при нормальных условиях выращивания, относительная представленность мРНК аллели гена *ARA7* в листьях мутантных растений была примерно в два раза ниже, чем в растениях ДТ, и эта разница была статистически достоверной (рис. 2а). В остальных случаях, мы не нашли существенных различий между растениями ДТ и мутантами. Таким образом, наличие вставки Т-ДНК в *ARA7*-промоторе и изменения в первичной структуре самого промотора уменьшило экспрессию (и/или стабильность?) мРНК мутантного аллеля *ARA7* в листьях растений при нормальных условиях и не оказало существенного влияния на уровень относительной представленности транскриптов в листьях при заселении и в корнях при всех условиях выращивания по сравнению с ДТ. Была также секвенирована последовательность, прилегающая к правой границе вставки Т-ДНК в мутантном аллеле гена *ARA7*.

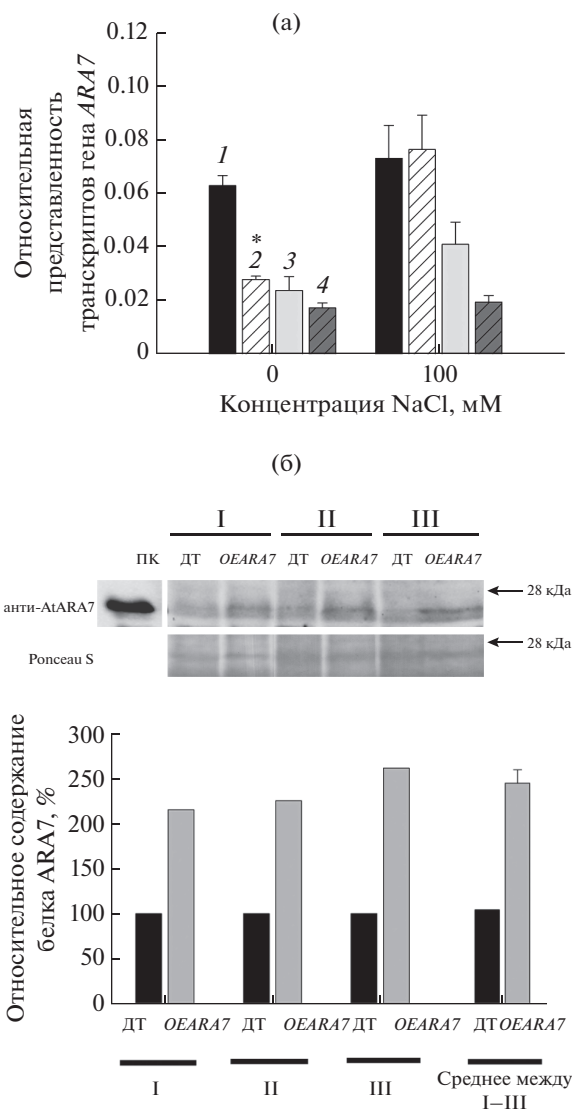
Для этой цели нами был получен и секвенирован фрагмент геномной ДНК мутантов размером 1400 п.о., амплифицированный с использованием праймеров Rba1 (находящегося в последовательности правого приграничного участка Т-ДНК) и TR1 (локализованного в последовательности соседнего с *ARA7* гена *TRAM*) (рис. 1а). Оказалось, что между последовательностью Т-ДНК и межгенным спейсером находится фрагмент ДНК неизвестной природы, состоящий из 111 п.о. Непосредственно за ним следует последовательность, состоящая из 27 п.о., идентичная началу 5'-НТО *ARA7* (включая 14 п.о., отсутствующих у мутанта). Вышеупомянутая неизвестная последовательность не относится ни к последовательности Т-ДНК, ни к последовательности генома *A. thaliana* и не депонирована в базе данных NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Таким образом, изменения в структуре ДНК, возникшие в процессе инсерционного мутагенеза, непосредственно не затрагивают последовательность гена *TRAM* и его нетранслируемых областей.

Определение относительной представленности транскриптов гена *TRAM*, граничащего с *ARA7*, в гомозиготных мутантных растениях и в растениях ДТ методом КОТ-ПЦР не выявило заметных различий между растениями ДТ и мутантами в одних и тех же органах растений (данные

Рис. 2. Экспрессия гена *AtARA7* в органах мутанта *OEARA7* и растений ДТ *A. thaliana*. (а) – относительная представленность мРНК гена *AtARA7* в органах *A. thaliana*, выращенных при различных концентрациях NaCl в питательной среде. Эксперименты проведены в трех независимых повторностях, каждая из которых включала смесь органов 20 индивидуальных растений на каждый вариант. Статистически достоверные различия между мутантом и ДТ показаны звездочкой: (*) – $P \leq 0.05$. 1 – ДТ, лист; 2 – *OEARA7*, лист; 3 – ДТ, корень; 4 – *OEARA7*, корень. (б) – иммуноблоттинг и квантификация экспрессии белка *atARA7* в суммарных клеточных лизатах, приготовленных из растений *A. thaliana* ДТ и мутантов *OEARA7* (три пары индивидуальных растений I–III), выращенных в нормальных условиях. 40 мкг лизатов были подвергнуты электрофорезу в 13% SDS-PAGE, перенесены на нитроцеллюлозную мембрану и подвергнуты Вестерн-блоттингу с анти-*atARA7* антителами. Результирующие изображения были подвергнуты количественному анализу на относительную экспрессию гена *ARA7* с использованием программы ImageJ, как описано в Материалах и Методах. ДТ – дикий тип, *OEARA7* – мутантная линия *OEARA7*, ПК – лизат штамма-продуцента BL-21 (pLysS) – *atARA7*-6 × His (положительный контроль), анти-*atARA7* – детекция с антителами, Ронсеау S – окраска красителем Ponceau S (контроль нанесения), средние значения – средние значения, вычисленные из значений, полученных для индивидуальных растений из трех пар.

не приведены). Как было показано выше, относительный уровень транскриптов мутантного аллеля гена *ARA7* в листьях был несколько снижен. При этом 5'-НТО данного аллеля была изменена в результате мутагенеза. Из этого можно предположить, что проявление мутантного фенотипа гена *ARA7*, возможно, является следствием изменений и в эффективности трансляции мРНК мутантного аллеля гена *ARA7*.

Для проверки данного предположения, мы использовали Вестерн-блот анализ суммарных белков *A. thaliana* с поликлональными антителами к синтетическому пептиду, уникальному для *atARA7* среди трех белков семейства Rab5 *A. thaliana*. Данный подход позволил идентифицировать иммунореактивный белок, имеющий молекулярную массу, приблизительно отвечающую молекулярной массе, предсказанной для *atARA7* (22 кДа) (рис. 2б). При более внимательном анализе изображения оказалось, что иммунореактивный белок представлен, по крайней мере, двумя полосами с близкими молекулярными массами, что, вероятно, отражает наличие в клетке двух форм *atARA7* – мембрано-связанной и растворимой [4, 5]. Нами также было показано, что содержание белка *atARA7* в мутантных растениях более чем в два раза превышало его содержание в растениях дикого типа (рис. 2б), несмотря на пониженную относительную представленность *ARA7* мРНК в данных растениях. Количественный анализ результатов Вестерн-блоттинга показал, что уровень экспрессии белка *ARA7* в листьях мутантных растений в среднем



превышал таковой в растениях ДТ более чем в два раза (рис. 2б). Таким образом, используемый в данной работе инсерционный мутант растений *A. thaliana* по гену *AtARA7* является мутантной линией с повышенной экспрессией (т. е. “сверхэкспрессирующей” линией), названной нами *OEARA7*. Следует заметить, что термин “сверхэкспрессия” подразумевает повышенную экспрессию исследуемого белка сверх нормы, без какого-либо знания его нормальных уровней экспрессии и характера этой экспрессии [20]. Однако, в нашем случае, наблюдалась довольно скромная сверхэкспрессия (примерно в 2.5 раза), поэтому мы предпочли использовать выражение “повышенная экспрессия” вместо “сверхэкспрессия”.

Проверка наличия дополнительных вставок Т-ДНК в геноме *ara7* (*OEARA7*) мутантов. По данным сайта (www.arabidopsis.org) не исключается наличие дополнительных вставок Т-ДНК в геноме мутан-

тов *OEARA7*. Для определения наличия и местоположения в геноме возможных дополнительных Т-ДНК-вставок использовали метод инвертированной ПЦР. При амплификации с использованием в качестве матрицы переваренной BamHI и затем лигированной геномной ДНК обнаруживался продукт, соответствующий только гену *ARA7* в случае матрицы, полученной из мутантных растений. В случае ДТ данный продукт не наблюдался (данные не приведены). Не наблюдались также специфические продукты амплификации других размеров, что позволило нам сделать вывод, что, скорее всего, мутанты *OEARA7* не содержат дополнительных Т-ДНК вставок в других участках генома.

Масса органов мутанта *OEARA7* и ДТ *A. thaliana* в норме и в условиях засоления ПР. Сравнение масс корней ДТ и *OEARA7* показывает, что мутация практически не повлияла на рост корней в отсутствие засоления. Напротив, мутация заметно стимулировала рост листьев при отсутствии соли в ПР (на 39%), но не оказала влияния на рост цветочных стрелок.

Хлористый натрий, внесенный в ПР в концентрации 50 мМ не оказал влияния на рост корней растений ДТ, 100 мМ NaCl незначительно подавил их рост. У мутантных растений реакция корней на засоление была иной. NaCl в концентрациях 50 и 100 мМ стимулировал их рост на 117 и 78% соответственно. Сравнение масс корней ДТ и *OEARA7* показывает, что мутация оказала сильное стимулирующее действие на их рост в условиях засоления (на 86 и 78% при концентрациях NaCl в ПР 50 и 100 мМ соответственно). На рост надземных органов (листья и цветочных стрелок) NaCl оказал сильное угнетающее действие, как у растений ДТ, так и у мутанта. 100 мМ NaCl подавил рост надземных органов сильнее, чем 50 мМ NaCl (рис. 3а–в). Тем не менее, мутация, как и в случае контроля, заметно стимулировала рост листьев при засолении (44 и 37% при 50 и 100 мМ NaCl соответственно). Не было обнаружено условий, при которых мутация *OEARA7* привела бы к снижению массы корней и надземных органов (рис. 3а–в).

Водный статус органов мутанта *OEARA7* и ДТ *A. thaliana* в норме и в условиях засоления ПР. На рис. 3г–е представлено действие мутации *OEARA7* на водный статус органов *A. thaliana* при разных концентрациях NaCl в ПР. Мутация привела к снижению оводненности корней на 27%, когда соль отсутствовала в ПР. Не было найдено различий в оводненности надземных органов (листья и цветочных стрелок) между *OEARA7* и ДТ при отсутствии NaCl. NaCl, понижающий водный потенциал ПР, практически не оказал влияния на оводненность (содержание воды в расчете на единицу сухой массы) корней ДТ и привел к заметному повышению оводненности корней мутанта (на 28 и 25% при 50 и 100 мМ NaCl соответственно).

Под действием NaCl наблюдалось относительно небольшое снижение оводненности надземных органов, как у *OEARA7*, так и у ДТ. Наиболее заметный эффект соли наблюдался на цветочных стрелках ДТ (снижение оводненности на 19 и 24% при 50 и 100 мМ NaCl соответственно). Мы не увидели различий в оводненности надземных органов между мутантом и ДТ в присутствии соли в среде. В условиях засоления (50 и 100 мМ NaCl) оводненность корней мутанта была такой же, как у ДТ.

Содержание ионов K^+ и Na^+ в органах мутанта *OEARA7* и ДТ *A. thaliana*. В отсутствие засоления содержание K^+ в листьях и цветочных стрелках мутанта *OEARA7* и ДТ было одинаковым. Содержание K^+ в корнях у *OEARA7* в отсутствие соли были выше, чем у ДТ (статистически достоверное различие 19%). Наличие NaCl в ПР в целом привело к снижению содержания K^+ в корнях и надземных органах, как у растений ДТ, так и у мутанта (рис. 4а–в). Средние значения содержания K^+ в корнях у *OEARA7* были выше, чем у ДТ при обеих концентрациях NaCl в ПР (50 и 100 мМ). В листьях *OEARA7* более высокое содержание K^+ по сравнению с ДТ было обнаружено при 100 мМ NaCl (на 27%). При 50 мМ NaCl содержание K^+ в листьях обоих типов растений было одинаковым. В цветочных стрелках мутация привела к увеличению содержания K^+ на 17 и 56% при 50 и 100 мМ NaCl соответственно. Не было найдено условий, при которых содержание K^+ в корнях и надземных органах *OEARA7* было бы ниже, чем у ДТ.

Мутация не привела к изменению содержания Na^+ во всех органах растений при нормальных условиях (рис. 4г–е). Содержание Na^+ в корнях, листьях и цветочных стрелках растений, как мутанта *OEARA7*, так и растений ДТ многократно возрастало по мере увеличения концентрации NaCl в ПР. Мутация *OEARA7* в целом привела к снижению содержания Na^+ в органах растений, выращенных в условиях засоления. В корнях *OEARA7* при 100 мМ NaCl в ПР содержание Na^+ было ниже, чем у ДТ на 42%, однако при 50 мМ NaCl статистически достоверного снижения содержания Na^+ в корнях у мутанта не произошло. Снижение содержания Na^+ в листьях у *OEARA7* по сравнению с ДТ составило 43% при 50 мМ NaCl, при этом не было обнаружено статистически достоверного снижения содержания Na^+ в листьях при 100 мМ NaCl. Мутация привела к сильному снижению содержания Na^+ в цветочных стрелках (на 76 и 46% при 50 и 100 мМ NaCl соответственно). Ни при каких условиях данного эксперимента мутация не вызвала увеличения содержания Na^+ в корнях, листьях и цветочных стрелках *A. thaliana*. В целом можно заключить, что мутация *OEARA7* привела к снижению содержания Na^+ и увеличению содержания K^+ в органах *A. thaliana*.

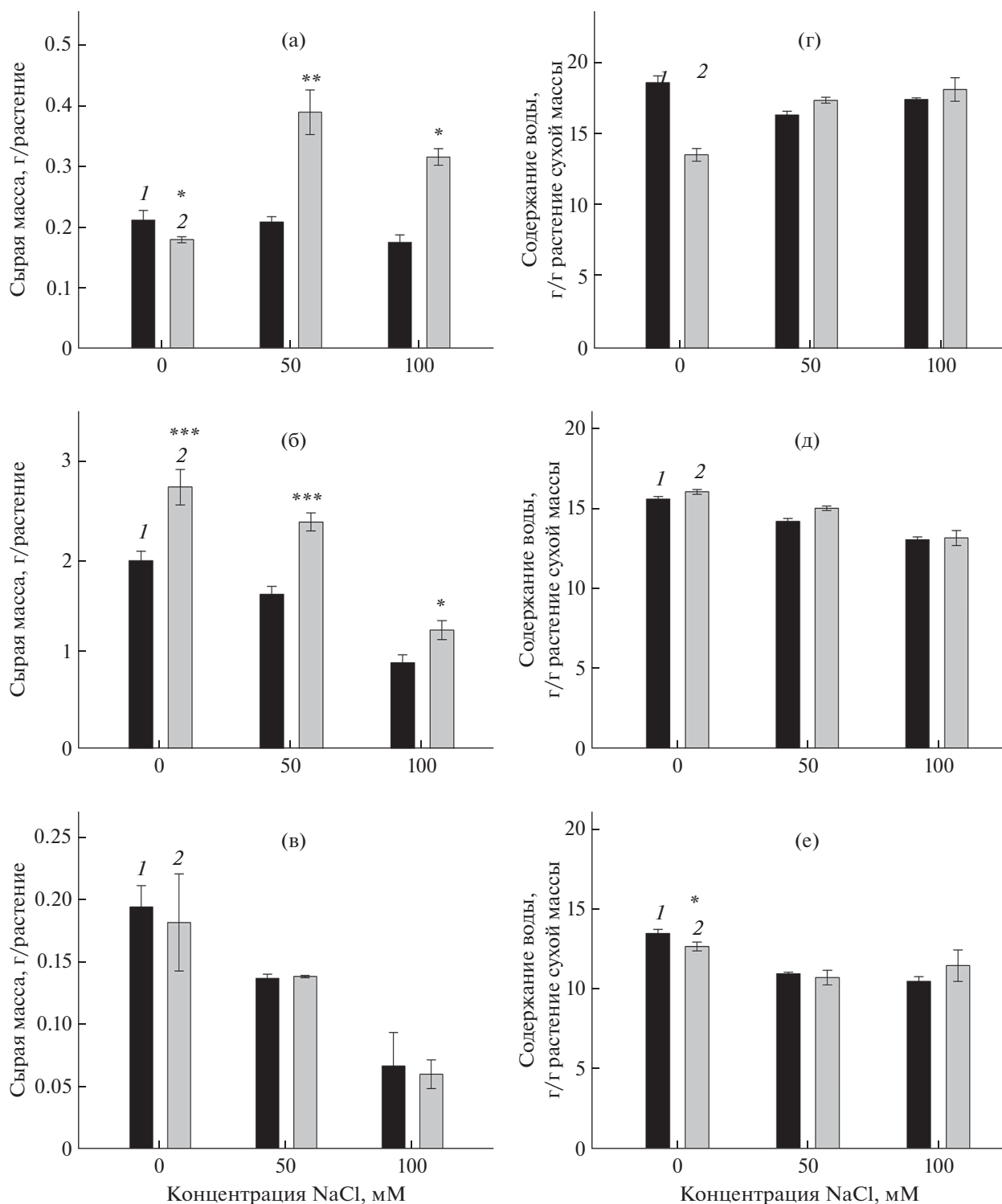


Рис. 3. Сырая масса (а–в) и оводненность (г–е) органов мутанта *OEARA7* и растений ДТ *A. thaliana* при разных концентрациях NaCl в ПР. 1 – ДТ, 2 – *OEARA7*; (а), (г) – корень; (б), (д) – лист; (в), (е) – цветочная стрелка. Представлены средние значения и их стандартные ошибки. Эксперименты проведены в четырех независимых повторностях, каждая из которых включала по четыре растения на каждый вариант. Статистически достоверные различия между мутантом и ДТ при разных значениях достоверности показаны звездочками: (*) – $P \leq 0.05$, (**) – $P \leq 0.01$, (***) – $P \leq 0.001$.

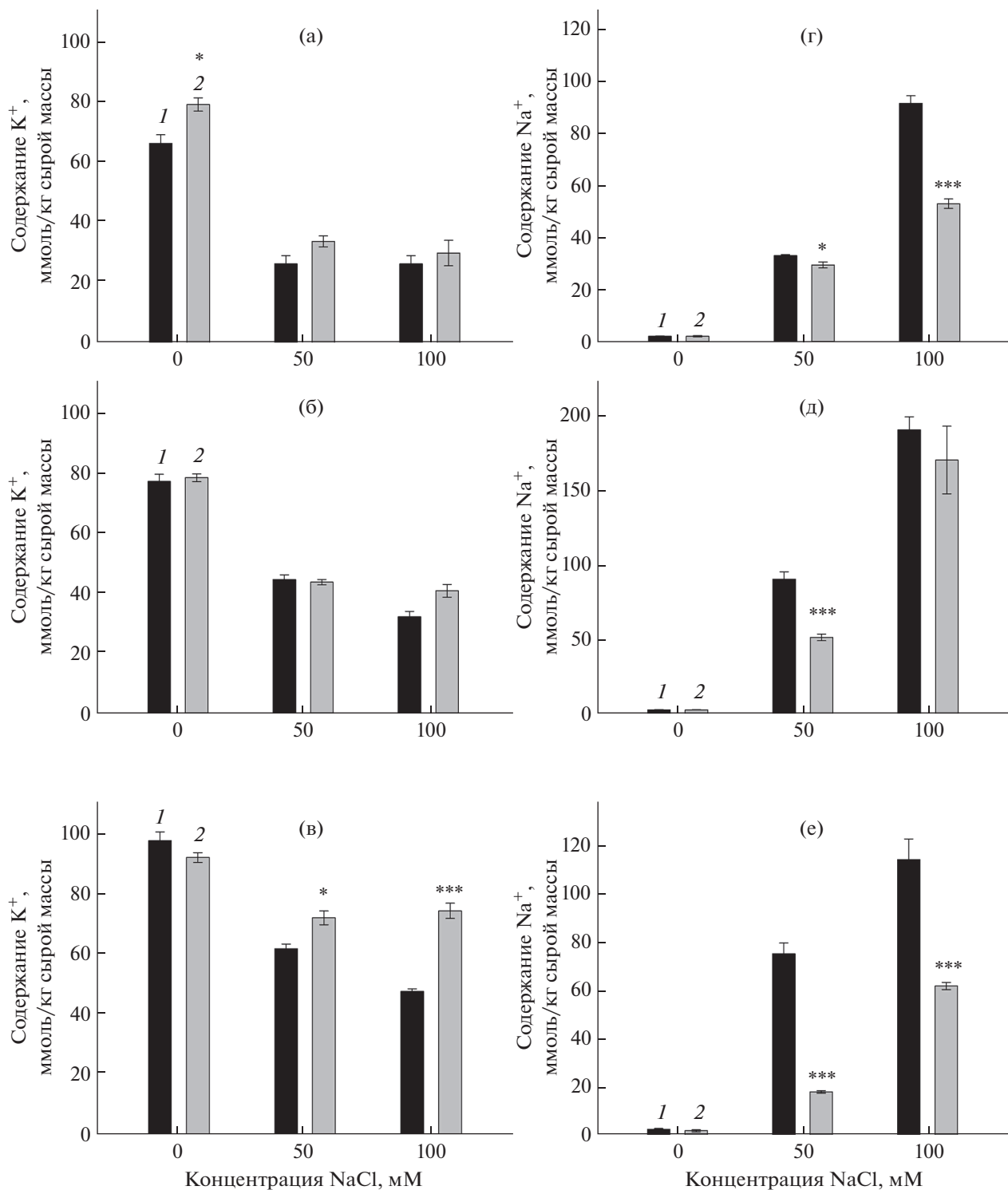


Рис. 4. Содержание K^+ (а–в) и Na^+ (г–е) в органах мутанта *OEARA7* и растений ДТ *A. thaliana* при разных концентрациях NaCl в ПР 1 – ДТ, 2 – *OEARA7*; (а), (г) – корень; (б), (д) – лист; (в), (е) – цветочная стрелка. Представлены средние значения и их стандартные ошибки. Эксперименты проведены в четырех независимых повторностях, каждая из которых включала по четыре растения на каждый вариант. Статистически достоверные различия между мутантом и ДТ при разных значениях достоверности показаны звездочками: (*) – $P \leq 0.05$, (**) – $P \leq 0.01$, (***) – $P \leq 0.001$.

Таблица 1. Количество и размеры мультивезикулярных тел (МВТ) на срезах клеток корней проростков ДТ и мутанта *OEARA7 A. thaliana*

Варианты	Количество МВТ/100 мкм ²	Средняя площадь МВТ, мкм ²	% площади всех МВТ к площади всех срезов
ДТ	2.01 ± 0.1 ^b	0.36 ± 0.08 ^c	0.72
ДТ + NaCl	3.94 ± 0.18 ^c	0.12 ± 0.03 ^a	0.48
<i>ara7</i>	1.39 ± 0.02 ^a	0.19 ± 0.04 ^{ab}	0.20
<i>ara7</i> + NaCl	4.49 ± 0.3 ^d	0.25 ± 0.06 ^b	1.11

Примечание. Растения выращены на средах с добавлением или без добавления 100 мМ NaCl. Учитывали МВТ площадью от 0.02 до 2.37 мкм² (0.07–0.65 мкм в диаметре). Статистический анализ выполнен с помощью Microsoft Excel 2007 (по 100 клеток на каждый вариант).

Таблица 2. Количество комплексов Гольджи, аутофагосом и аутофагических тел на срезах клеток корней проростков ДТ и мутанта *OEARA7 A. thaliana*

Варианты	Количество КГ/100 мкм ²	Количество АФ/100 мкм ²	Количество АТ/100 мкм ²
ДТ	2.56 ± 0.13 ^b	0.91 ± 0.05 ^a	1.00 ± 0.09 ^a
ДТ + NaCl	2.88 ± 0.16 ^b	1.41 ± 0.09 ^b	1.31 ± 0.11 ^b
<i>ara7</i>	1.76 ± 0.1 ^a	0.89 ± 0.03 ^a	1.27 ± 0.13 ^b
<i>ara7</i> + NaCl	1.69 ± 0.08 ^a	1.71 ± 0.1 ^c	2.98 ± 0.19 ^c

Примечание. Растения выращены на средах с добавлением или без добавления 100 мМ NaCl. Статистический анализ выполнен с помощью программы Microsoft Excel 2007 (по 100 клеток на каждый вариант).

Ультраструктура клеток корней мутанта *OEARA7* и ДТ *A. thaliana*, выращенных на засоленном питательном растворе. Электронно-микроскопическое исследование клеток эпидермы и коры корней мутанта *OEARA7* и ДТ *A. thaliana* проводили на 4-дневных проростках, выращенных на ПР, который содержал или не содержал NaCl. Ультраструктура клеток корня растений ДТ, выращенных на ПР без NaCl, была типичной для растений, растущих на пресном субстрате (рис. 5а–е). Цитоплазма содержала различные органеллы и включения. Эндоплазматический ретикулум (ЭР) был хорошо развит. Помимо большой центральной вакуоли встречались микровacuоли (МВ), которые иногда сливались друг с другом или с центральной вакуолью (рис. 5а). Некоторые из микровacuолей содержали мембранный материал, который подвергался лизису. При этом обнаруживались мультивезикулярные тела (МВТ/ПЭ) (рис. 5д, е). Иногда наблюдалось слияние наружной мембраны МВТ с ПМ и выход внутренних везикул МВТ в периплазматическое пространство (ПП), т. е. происходило образование экзосом (Экз) (рис. 5д). Можно было также наблюдать слияние МВТ с тонопластом (рис. 5е). Диктиосомы аппарата Гольджи (АГ) были плотно упакованы, на *транс*-стороне иногда наблюдались отпочковывающиеся от диктиосом везикулы ТГС/РЭ (рис. 5в, г, е). В цитоплазме встречались аутофагосомы (АФ), а в вакуолях аутофагические

тела (АТ), содержащие разного рода цитоплазматический материал, который, по-видимому, подвергался деградации (рис. 5б–г).

В клетках корней растений *OEARA7*, выращенных на ПР без NaCl, не было обнаружено заметных качественных отличий в структуре большинства органелл от растений ДТ (рис. 6а–е). Так же как у ДТ, наблюдалось слияние микровacuолей друг с другом или с центральной вакуолью и сливающиеся с тонопластом МВТ/ПЭ (рис. 6б, в, е). ЭР был хорошо развит, цистерны ЭР не были набухшими. АФ в цитоплазме и АТ в вакуолях имели такой же вид, как у растений ДТ, выращенных в ПР без NaCl. В отличие от ДТ у *OEARA7* наблюдались некоторые количественные отличия. Содержание МВТ в расчете на единицу площади срезов у *OEARA7* имело тенденцию к снижению, однако различие с ДТ не было статистически достоверным. Средняя площадь МВТ в результате мутации стала на 47% меньше, чем у ДТ (табл. 1). У мутанта также на 31% снизилось содержание АГ. В отсутствие засоления мутация не привела к изменениям количества МВ и их средней площади, а также количества АФ в цитоплазме и АТ в вакуолях (табл. 2).

Ультраструктура клеток корня ДТ *A. thaliana* в условиях засоления ПР претерпела ряд изменений (рис. 5ж–м). В частности, наблюдалось набу-

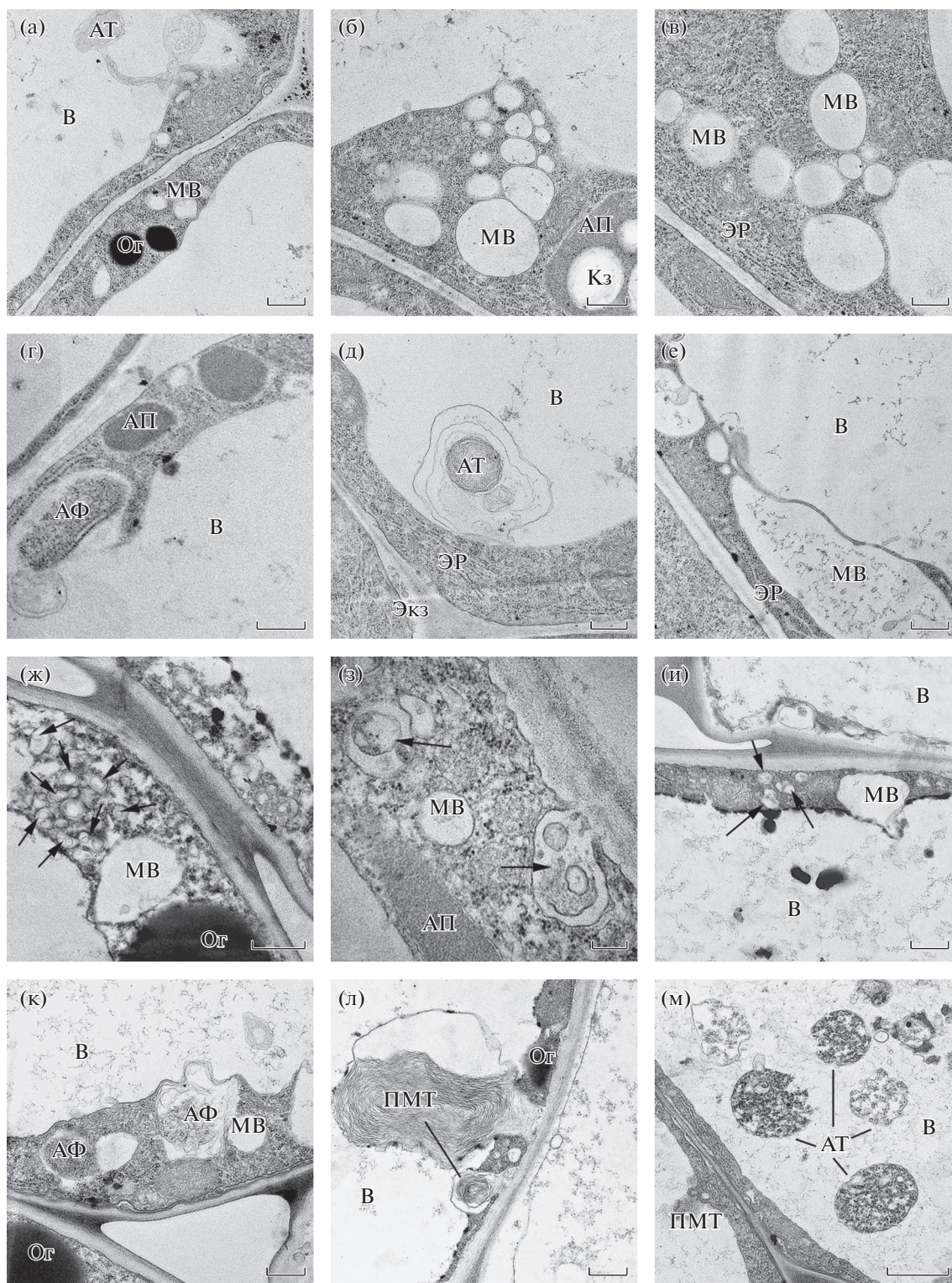


Рис. 5. Ультраструктура клеток корня 4-дневных проростков *A. thaliana* ДТ, выращенных на ПР без NaCl (а–е) или ПР, содержащем 100 мМ NaCl (ж–м). Обозначения: МВ – микровакуоль, В – вакуоль, АТ – аутофагическое тело, ЭР – эндоплазматический ретикулум, Экз – экзосомы, АГ – аппарат Гольджи, АФ – аутофагосома, АП – амилопласт, ПМТ – парамуральное тело. Стрелками отмечены мультивезикулярные тела (МВТ). Масштабный отрезок – 0,5 мкм (а, г–ж); 1 мкм (б, з–м).

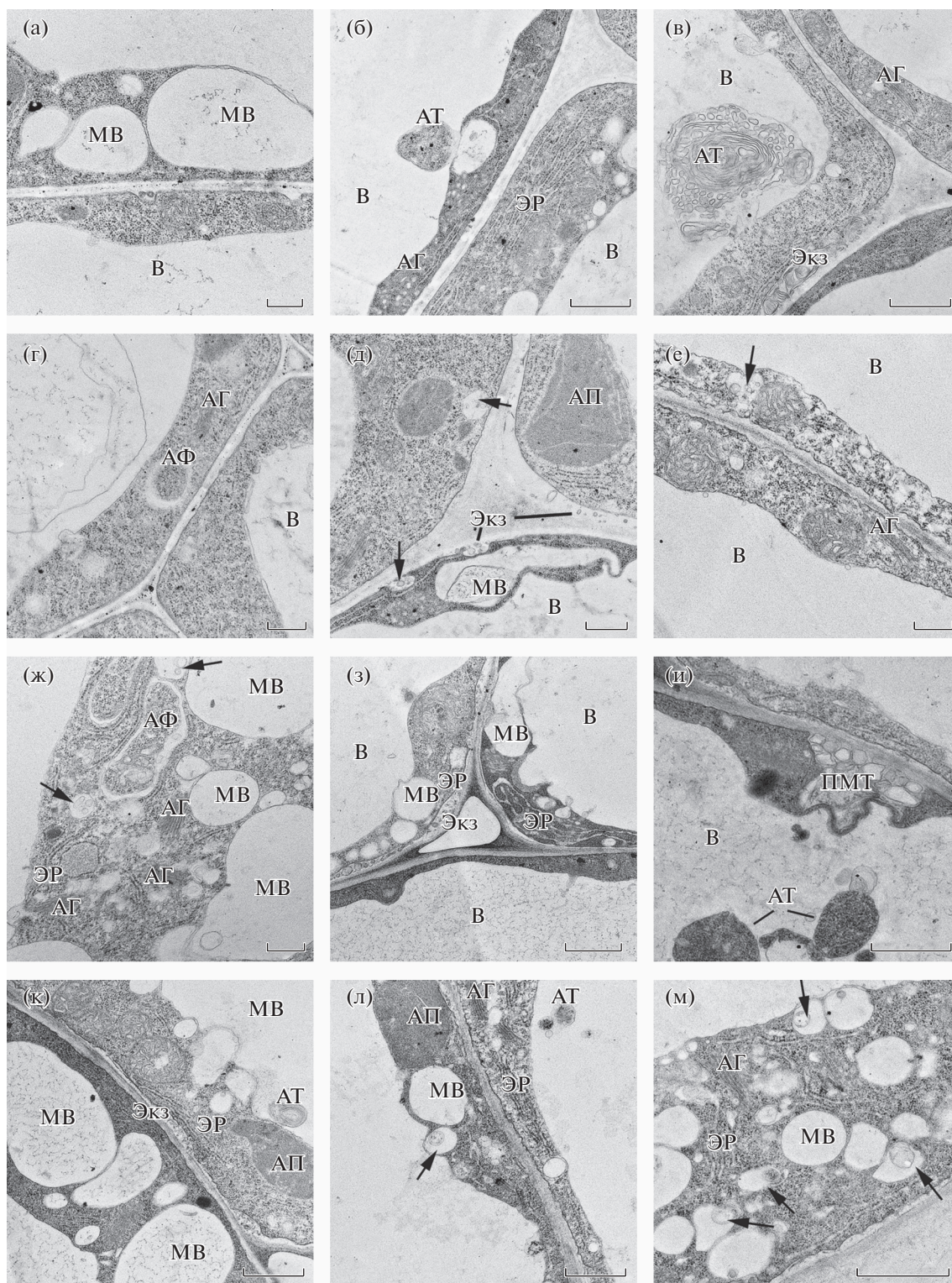


Рис. 6. Ультраструктура клеток корня 4-дневных проростков мутанта *OEARA7 A. thaliana*, выращенных на ПР без NaCl (а–е) или ПР, содержащем 100 мМ NaCl (ж–м). Обозначения: MB – микровакуоль, В – вакуоль, АГ – аутофагическое тело, АП – амилопласт, АФ – аутофагосома, ЭР – эндоплазматический ретикулум, ЭКЗ – экзосомы, ПМТ – парамуральное тело. Стрелками отмечены мультивезикулярные тела (MBT). Масштабный отрезок – 0.2 мкм (з); 0.5 мкм (а–е, ж, и–л); 1 мкм (м).

Таблица 3. Количество и размеры микровакуолей (МВ) на срезах клеток корней проростков ДТ и мутанта *OEARA7A. thaliana*

Варианты	Количество МВ/100 мкм ²	Средняя площадь МВ, мкм ²	% площади всех МВ к площади всех срезов
ДТ	10 ± 0.96 ^a	0.47 ± 0.11 ^a	4.73
ДТ + NaCl	17 ± 0.51 ^c	0.62 ± 0.15 ^a	10.80
<i>ara7</i>	11 ± 0.98 ^a	0.54 ± 0.11 ^a	6.08
<i>ara7</i> + NaCl	13 ± 0.44 ^b	0.47 ± 0.12 ^a	5.96

Примечание. Растения выращены на средах с добавлением или без добавления 100 мМ NaCl. Учитывали МВ площадью от 0.07 до 18.5 мкм² (0.25–5.0 мкм в диаметре). Статистический анализ выполнен с помощью Microsoft Excel 2007 (по 100 клеток на каждый вариант).

хание цистерн ЭР, которые фрагментировались и формировали микровакуоли угловатой формы (рис. 5ж, з). Наблюдалась более выраженная вакуолизация цитоплазмы в целом, чем при отсутствии NaCl в ПР. Число вакуолей в расчете на единицу площади поверхности срезов и их средняя площадь возросли на 70 и 32% соответственно (табл. 3). Инвагинации тонопласта в вакуоль, а также микровакуоли, сливающиеся друг с другом или с центральной вакуолью в условиях засоления у ДТ встречались чаще, чем при отсутствии NaCl в ПР (рис. 5ж, з, к–м). Иногда обнаруживались двумембранные инвагинации, в сторону вакуоли, образованные одновременно двумя мембранами – ПМ и тонопластом (рис. 5и). Такие структуры, известные как парамуральные тела (ПМТ) [3], ранее наблюдались нами у галофита *Suaeda altissima* [21]. У растений ДТ в отсутствие засоления они практически не встречались. При засолении у ДТ увеличилось также количество МВТ/ПЭ. Их число в расчете на единицу площади поверхности срезов возросло практически в 2 раза, при этом их средняя площадь уменьшилась в 3 раза (табл. 1, рис. 5ж, л, м). Экзосомы в ПП в варианте с NaCl встречались чаще, чем в отсутствие засоления (рис. 5з–м). Аппарат Гольджи у растений ДТ, выращенных на ПР с NaCl, казался более активным, то есть больше отпочковывал от себя везикул ТГС/РЭ, чем в отсутствие засоления (рис. 5ж, л, м). При этом количество комплексов Гольджи (КГ) в расчете на единицу площади срезов было таким же, как у растений, выращенных на ПР без NaCl (табл. 2). АФ в цитоплазме и АТ в вакуолях растений ДТ в условиях засоления встречались на 55% чаще, чем при его отсутствии (табл. 2, рис. 5ж, и, к, л). Наблюдалась также тенденция к увеличению содержания АТ в вакуолях, хотя различие в этом параметре в присутствии и отсутствии NaCl в ПР не была статистически достоверной.

Наличие NaCl в ПР вызвало небольшое (18%), но статистически достоверное увеличение количества МВ у мутанта. В результате мутации про-

изошло снижение, как количества, так и средней площади МВ в условиях засоления (на 24 и 32% соответственно) (табл. 3). И мутация, и NaCl оказали существенное влияние на количество и размеры МВТ. Засоление ПР привело к увеличению содержания МВТ у *OEARA7* в 3 раза, при этом средняя площадь МВТ возросла на 37%. В условиях засоления влияние мутации выразилось в небольшом (14%), но статистически достоверном увеличении количества МВТ и в двукратном увеличении их средней площади (табл. 1), а также в снижении на 41% содержания АГ (табл. 2). Клетки мутантов, выращенных на ПР с NaCl, характеризовались повышенным содержанием АФ в цитоплазме и АТ в вакуоли, что может указывать на активный процесс аутофагии и перенос цитоплазматического материала в вакуоль посредством аутофагии (табл. 2, рис. 6к, м). При этом увеличение содержания аутофагических структур было результатом, как засоления ПР, так и мутации. При выращивании растений на ПР с NaCl в клетках *OEARA7*, также как в клетках ДТ, встречались ПМТ (рис. 5л). Следует отметить, что у мутанта в условиях засоления мы не наблюдали набухания цистерн ЭР и формирования МВ неправильной формы, а также редко встречали экзосомы в ПП. Характерной особенностью ультраструктуры клеток мутантных растений, выращенных на ПР с NaCl (рис. 6ж–м), было наличие на тонопласте и в вакуоли электронно-плотного материала, который имел вид отдельных точечных скоплений (рис. 6ж, и, л) и часто, отделившись от тонопласта, оказывался в вакуоли (рис. 6и). Не исключено, что отложение этого материала на вакуолярной мембране приводит к нарушению переноса веществ в вакуоль.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе мы использовали инсерционный мутант *OEARA7* (SALK_090266C), белка семейства малых ГТФаз Rab5. Определение точной локализации вставки Т-ДНК и секвенирование примыкающих к ней областей хромосомы выяви-

ли многочисленные изменения в первичной последовательности ДНК. Данные изменения привели к статистически достоверному уменьшению относительной представленности мРНК гена *ARA7* в листьях мутантных растений, примерно в два раза по сравнению с ДТ, при нормальных условиях (рис. 2а). Можно предположить, что мутации в промоторе гена *ARA7* изменили последовательность сайта связывания и вызвали ослабление связывания или полностью предотвратили связывание транскрипционного фактора(ов) – положительного регулятора при нормальных условиях, и менее активного или неактивного при условиях засоления. Также возможно, что вставка Т-ДНК изменила расстояние между сайтом связывания вышеупомянутого фактора и ТАТА-боксом гена *ARA7*, уменьшив вклад этого фактора в активацию транскрипции. Это, в свою очередь, привело к уменьшению экспрессии гена *ARA7* в мутантных растениях. Также не исключено, что данная мутация каким-то образом привела к уменьшению стабильности *ARA7* мРНК при выращивании растений в условиях засоления. В остальных случаях, изменения в первичной структуре примыкающих к вставке областей хромосомы не оказали существенного влияния на относительную представленность мРНК гена *ARA7*, а также соседнего с ним гена *TRAM* (At4g19645.1) при всех условиях выращивания. Таким образом, мутантный фенотип не является следствием нарушения экспрессии гена *TRAM*.

Вестерн-блот анализ тотальных клеточных лигандов листьев растений ДТ и мутантов показал, что иммунореактивный белок представлен, по крайней мере, двумя полосами с близкими молекулярными массами (рис. 2б), что, возможно, отражает наличие в клетке двух форм AtARA7 – мембраносвязанной (верхней) и растворимой (нижней) [4, 5]. Молекулярная масса нижней полосы меньше, чем у контрольного рекомбинантного белка atARA7-6 X His, какую и следует ожидать у посттрансляционно немодифицированного белка AtARA7. Возможно также, что множественность иммунореактивных форм (полос) отражает посттрансляционные модификации данного белка, например, его фосфорилирование.

С использованием Вестерн-блот анализа мы показали, что мутантные растения содержали в 2.5 раза больше белка *ARA7*, чем растения ДТ, при нормальных условиях выращивания (рис. 2б). Выяснение точной природы повышенной экспрессии гена *ARA7* у данной мутантной линии *OEARA7 A. thaliana* не входило в цели данного исследования. Можно предположить, что это увеличение могло произойти в результате мутаций, произошедших в 5'-НТО гена *ARA7* при проведении инсерционного мутагенеза. Хорошо известно, что лидерная 5'-НТО мРНК участвует в регуляции ее трансляции с использованием множественных механизмов, а

также в регуляции ее экспорта из ядра клетки. Например, эффективность инициации трансляции мутантной мРНК *ARA7* может быть повышена, т. к. три первых нуклеотида в ее 5'-НТО отсутствуют, что, в свою очередь, может повлиять на эспирование и, как следствие этого, привести к повышению эффективности рекрутирования eIF4E – иницирующего комплекса данной мутантной мРНК. Участие других механизмов регуляции трансляции через 5'-НТО также возможно, т. к. описанная нами делеция в данной области *ARA7* должна изменить ее вторичную структуру, важную для регуляции трансляции (например, по механизму riboswitches). Нельзя исключить и комбинацию вышеописанных механизмов. Необходимо также отметить, что изменение стабильности белка *ARA7* в мутантных растениях в данном случае маловероятно, т. к. его первичная последовательность в результате инсерционного мутагенеза осталась неизменной. Все вышеприведенные возможные механизмы являются только гипотетическими и требуют экспериментальной проверки. По-видимому, увеличение синтеза белка в мутантных растениях “пересилило” уменьшение экспрессии мРНК гена *ARA7*, что в конечном итоге и привело к накоплению *ARA7* в мутантных растениях.

Следует отметить, что фенотипы растений, сверхэкспрессирующие различные формы (аллели) белка *ARA7*, были описаны ранее [9]. Было показано, что сверхэкспрессия конститутивно активного мутанта *ARA7*, GFP-*ARA7* (Q69L), индуцирует увеличение МБТ с образованием больших кольцеобразных структур, что также может быть вызвано экспрессией мутантного белка *ARA7* (Q69L), не слитого с GFP. В то же время, при сверхэкспрессии ДТ версии белка GFP-*ARA7* подобного не наблюдалось. Более подробного описания фенотипа растений, сверхэкспрессирующих ДТ версию белка GFP-*ARA7*, в том числе, на уровне ультраструктуры, авторами не приводится. Таким образом, наша работа является первым исследованием, где подробно описывается фенотип растений, экспрессирующих повышенные количества ДТ версии белка *ARA7*, в том числе и на ультраструктурном уровне.

В нашем случае, мутация *OEARA7* привела к существенному увеличению биомассы корней и листьев *A. thaliana* при выращивании растений в условиях засоления, а листьев также и при отсутствии NaCl в ПР (рис. 3а–в). Мутантные растения, выращенные на ПР с NaCl, были способны поддерживать содержание воды на уровне, наблюдавшемся у растений ДТ (рис. 3г–е). В корнях, листьях и цветочных стрелках у мутантов в условиях засоления содержание K^+ было выше, а содержание Na^+ ниже, чем у ДТ (рис. 4). Соответственно, отношение содержания Na^+ к содержанию K^+ в органах (K^+/Na^+), используемое как индикатор

тор солеустойчивости растений, у мутанта было более высоким, чем у ДТ. В целом, эти данные показывают, что мутация *OEARA7* стимулирует рост и улучшает ионный и водный статус растений в условиях засоления, что позволяет сделать вывод о более высокой солеустойчивости мутанта *OEARA7*, чем растений ДТ.

Проведенное нами электронно-микроскопическое исследование клеток корня *OEARA7* и ДТ *A. thaliana* выявило у мутанта существенные изменения в структурах, вовлеченных в эндосомальный транспорт и аутофагию (рис. 5, 6). Интегральный показатель степени вакуолизации клеток – процент площади, занятой на срезах микровакуолями (табл. 3), возрастал, как вследствие засоления ПР, так и в результате мутации, хотя не наблюдалось синергизма в действии этих двух факторов. Наоборот, у мутанта, выращенного на ПР с NaCl этот показатель был ниже, чем у ДТ, выращенного в тех же условиях. Повышенная вакуолизация цитоплазмы клеток корней мутанта и растений ДТ при засолении, по-видимому, связана с необходимостью компартиментализации Na⁺. С этим предположением согласуется более высокое содержание Na⁺ в корнях ДТ, чем в корнях мутанта, при выращивании растений на ПР с NaCl (рис. 4). По-видимому, существенный вклад в вакуолизацию цитоплазмы растений ДТ при засолении вносил ЭР, формирующий в этих условиях МВ неправильной формы (рис. 5ж, з). Соответствующий интегральный показатель для МВТ, процент площади, занятой этими органеллами на срезах, отражающий как их среднюю площадь, так и их количество (табл. 1), снижался в результате мутации и в ответ на засоление. Однако при совместном действии этих двух факторов он возрастал, указывая в целом на интенсивное образование и развитие МВТ у мутанта в условиях засоления. МВТ играют важную роль в везикулярном транспорте. Эти органеллы вовлечены как в секреторный, так и в эндоцитозный пути переноса веществ и участвуют в реконструкции белкового состава мембран [1, 22]. Интенсивное образование и развитие МВТ/ПЭ могут указывать на активирование путей эндосомального транспорта и более эффективную доставку белков в мембраны, необходимых для преодоления солевого стресса. Такими белками могут быть ионные каналы, транспортеры, транспортные АТФазы и компоненты путей передачи сигналов.

МВТ/ПЭ образуются в результате созревания РЭ, которые, в свою очередь, являются продуктом АГ [1, 22]. Вовлеченные в ВТ органеллы, в том числе аппарат Гольджи, являются динамичными структурами [23, 24]. Уменьшенное содержание комплексов Гольджи в цитоплазме клеток корня мутанта *OEARA7* (табл. 2) может быть связано с ускорением биогенеза пост-Гольджи орга-

нелл (ранних и поздних эндосом). Изменения в размерах МВТ под действием мутагенеза и NaCl (табл. 1, рис. 5ж, л, м) также можно отнести к изменениям в скоростях образования и последующего превращения этих органелл.

Недавно было показано, что МВТ/ПЭ у растений вовлечены не только в эндоцитозный и секреторный пути транспорта веществ, но также и в деградацию белков посредством аутофагии [23]. Мы обнаружили, что количество аутофагических структур в клетках *A. thaliana* возрастало, как в ответ на засоление, так и в результате мутации *OEARA7* (табл. 2). Активирование этого процесса было особенно выражено при одновременном действии этих двух факторов и сопровождалось возрастанием содержания МВТ/РЭ (табл. 3). Полученный результат подтверждает наличие взаимодействия между эндосомальным транспортом и аутофагией и указывает на вовлечение ARA7 в регуляцию переноса цитоплазматического материала в вакуоль посредством аутофагии при действии на растение NaCl. Известно, что аутофагия является ответом растений на засоление и водный дефицит [25], а также на окислительный стресс [26], который является вторичным по отношению к другим стрессам, в том числе, к вызванному высокими концентрациями NaCl.

Мы предполагаем, что мутантный фенотип связан с изменениями содержания ион-транспортирующих белков в мембранах, опосредованными везикулярным транспортом. Имеются сведения о динамической регуляции содержания ион-транспортирующих белков в мембранах посредством ВТ. Например, абсцизовая кислота (АБК), контролирующая ионный транспорт и транспирацию при водном дефиците, индуцировала селективный эндоцитоз входного (inward rectifying) K⁺-канала KAT1 в ПМ замыкающих клеток устьиц *A. thaliana*. Это, в свою очередь, уменьшало поток K⁺ в клетки, приводило к снижению тургорного давления и стимулировало закрывание устьиц [26, 27]. Другим примером регуляции транспортного белка посредством эндоцитоза у растений являются индуцированные высокими концентрациями бора в среде изменения в содержании транспортера BOR1 плазмалеммы, который загружает бор в ксилему корня *A. thaliana*. Транспортер BOR1 в этих условиях подвергался эндоцитозу и с везикулами транспортировался от ПМ к ПЭ/МВТ/ПВК, которые созрели затем в ПЭ/МВТ/ПВК. Находясь в составе мембран внутренних везикул ПЭ, наружная мембрана которых сливалась с тонопластом, BOR1, в конце концов, оказывался в вакуоли, где подвергался деградации [28].

Встает вопрос, каким образом изменения в экспрессии белка ARA7, регулирующего ВТ, могут быть связаны с предполагаемыми изменениями в содержании ион-транспортирующих белков

мембран. В нашем случае, увеличение экспрессии активной формы *ARA7* могло быть причиной таких изменений. Известно, что биологические последствия сверхпродукции исследуемого белка часто определяются не наличием самой этой сверхпродукции, а, скорее, являются результатом изменения баланса между начавшим экспрессироваться сверх нормы целевым белком и другими белками или мультисубъединичными белковыми комплексами клетки [29, 30]. Подобный “loss of fidelity” фенотип является индикатором участия изучаемого белка в клеточных процессах, интересующих исследователей. Например, повышение уровней экспрессии индивидуальных факторов, участвующих в адресации мембранных везикул к целевым мембранам может уменьшить специфичность этого процесса, что в результате приведет к нарушению правильной локализации целевых белков. Так, у пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, сверхэкспрессия *Sec22* (R-SNARE, циркулирует между ЭР и Гольджи), *Bet1* (V-SNARE, необходим для транспорта между ЭР и Гольджи) или *Sly41* (необходим для транспорта между ЭР и Гольджи, упакован в везикулы *Cor119*), способна восстанавливать даже летальную для клетки полную потерю функции малой Rab ГТФазы *Ypt1* (SNARE-связывающая ГТФаза, необходима для причаливания и отпочковывания везикул и мембранных взаимодействий внутри комплекса Гольджи, локализована в ЭР и Гольджи), что, скорее всего, связано с “loss of fidelity” фенотипом, как следствие нарушения правильной доставки вышеупомянутых сверхпродуцируемых белков [29, 30]. Возможно, в нашем случае, вызванное мутацией *OEARA7* повышение количества *ARA7* в клетке изменило баланс между тремя Rab5 ГТФазами (*ARA6*, *ARA7* и *RHA1*), что, в свою очередь, привело к пертурбациям секреторного пути к ПМ, модификации состава ион-транспортирующих белков ПМ и, соответственно, к изменению ионного статуса растений *A. thaliana*. Повышенное содержание K^+ и сниженное содержание Na^+ в клетках, в свою очередь, стимулировало рост мутантных растений в условиях засоления.

В целом проведенное исследование показывает, что повышенный уровень экспрессии гена *ARA7*, участвующего в регуляции ВТ, приводит к повышению солеустойчивости *A. thaliana*. Наши дальнейшие исследования будут направлены на выяснение роли везикулярного транспорта в регуляции содержания ион-транспортирующих белков в ПМ в условиях солевого стресса.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № АААА-А121040800153-1). Авторы благодарят к.б.н Е.С. Пожидаеву за рекомендации в постановке КОТ-ПЦР экспериментов на приборе АНК-32 и к.б.н. Д. В. Бе-

ляева за помощь в подборе праймеров для определения гомозиготности растений по гену *ARA7*.

О.В. Сергиенко и Л.А. Халилова внесли равный вклад в данную работу.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Otegui M.S., Spitzer C. Endosomal function sinplants // Traffic. 2008. V. 9. P. 1589.
2. Ebine K., Miyakawa N., Fujimoto M., Uemura T., Nakano A., Ueda T. Endosomal trafficking pathway regulated by *ARA6*, a RAB5 GTPase unique to plants // Small GTPases. 2012. V. 3. P. 23.
3. Goh T., Uchida W., Arakawa S., Ito E., Dainobu T., Ebine K., Takeuchi M., Sato K., Ueda T., Nakano A. VPS9a, the common activator for two distinct types of Rab5 GTPases, is essential for the development of *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell. 2007. V. 19. P. 3504.
4. Ebine K., Ueda T. Unique mechanism of plant endocytic/vacuolar transport pathways // J. Plant Res. 2009. V. 122. P. 21.
5. Ueda T., Yamaguchi M., Uchimiya H., Nakano A. *Ara6*, a plant – unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway in *Arabidopsis thaliana* // EMBO J. 2001. V. 20. P. 4730.
6. Sohn E.J., Kim E.S., Zhao M., Kim S.J., Kim H., Kim Y.W., Lee Y.J., Hillmer S., Sohn U., Jiang L., Hwang I. *Rha1*, an *Arabidopsis* Rab5 homolog, plays a critical role in the vacuolar trafficking of soluble cargo proteins // Plant Cell. 2003. V. 15. P. 1057.
7. Kotzer A. M., Brandizzi F., Neumann U., Paris N., Moore I., Hawes C. *AtRabF2b* (*Ara7*) acts on the vacuolar trafficking pathway in tobacco leaf epidermal cells // J. Cell Sci. 2004. V. 117. P. 6377.
8. Dhonukshe P., Baluška F., Schlicht M., Hlavacka A., Šamaj J., Friml J., Gadella Jr. T.W.J. Endocytosis of cell surface material mediates cell plate formation during plant cytokinesis // Dev. Cell. 2006. V. 10. P. 137.
9. Jia T., Gao C., Cui Y., Wang J., Ding Y., Cai Y., Ueda T., Nakano A., Jiang L. *ARA7(Q69L)* expression in transgenic *Arabidopsis* cells induces the formation of enlarged multivesicular bodies // J. Exp. Bot. 2013. V. 64. P. 2817.
10. Ebine K., Fujimoto M., Okatani Y., Nishiyama T., Goh T., Ito E., Dainobu T., Nishitani A., Uemura T., Sato M. H., Thordal-Christensen H., Tsutsumi N., Nakano A., Ueda T. A membrane trafficking pathway regulated by the plant – specific RAB GTPase *ARA6* // Nature Cell Biol. 2011. V. 13. P. 853.
11. Mazel A., Leshem Y., Tiwari B.S., Levine A. Induction of salt and osmotic stress tolerance by overexpression of an intracellular vesicle trafficking protein *AtRab7* (*AtRabG3e*) // Plant Physiol. 2004. V. 134. P. 118.
12. Mimura T., Kura-Hotta M., Tsujimura T., Ohnishi M., Miura M., Okazaki Y., Mimura M., Maeshima M., Washitani-Nemoto S. Rapid increase of vacuolar vol-

- ume in response to salt stress // *Planta*. 2003. V. 216. P. 397.
13. Hamaji K., Nagira M., Yoshida K., Ohnishi M., Oda Y., Uemura T., Goh T., Sato M.H., Morita M.T., Tasaka M., Hasezawa S., Nakano A., Hara-Nishimura I., Maeshima M., Fukaki H. et al. Dynamic aspects of ion accumulation by vesicle traffic under salt stress in *Arabidopsis* // *Plant Cell Physiol*. 2009. V. 50. P. 2023.
 14. Leshem Y., Melamed-Book N., Cagnac O., Ronen G., Nishri Y., Solomon M., Cohen G., Levine A. Suppression of *Arabidopsis* vesicle – SNARE expression inhibited fusion of H₂O₂ containing vesicles with tonoplast and increased salt tolerance // *PNAS*. 2006. V. 103. P. 18008.
 15. Baral A., Irani N. G., Fujimoto M., Nakano A., Mayor S., Mathew M. K. Salt – induced remodeling of spatially restricted clathrin – independent endocytic pathways in *Arabidopsis* root // *Plant Cell*. 2015. V. 27. P. 1297.
 16. Gibeaut D.M., Hulett J., Cramer G.R., Seemann J.R. Maximal biomass of *Arabidopsis thaliana* using a simple, low – maintenance hydroponic method and favorable environmental conditions // *Plant Physiol*. 1997. V. 115. P. 317.
 17. Malinska K., Jelinkova A., Petrsek J. The use of FM dyes to analyze plant endocytosis // *Plant endosomes. Methods and protocols.* / Ed. Otegui M.S. New York: Humana Press, 2014. P. 1.
 18. de Vries S., Hoge H., Bisseling T. Isolation of total and polysomal RNA from plant tissues // *Plant molecular biology manual.* / Eds. Gelvin S.B., Schilperoort R.A., Verma D.P.S. Netherlands, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 1988. P. 1.
 19. Wang H., Wang J., Jiang J., Chen S., Guan Z., Liao Y., Chen F. Reference genes for normalizing transcription in diploid and tetraploid *Arabidopsis* // *Sci. Rep*. 2014. V. 4. P. 6781.
 20. Prelich G. Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation // *Genetics*. 2012. V. 190. P. 841.
 21. Balnokin Yu.V., Kurkova E.B., Myasoedov N.A., Khalilova L.A., Yusufov A.G. Pinocytosis in the root cells of a salt-accumulating halophyte *Suaeda altissima* and its possible involvement in chloride transport // *Russ. J. Plant Physiol*. 2007. T. 54. C. 797.
 22. Sutter J.-U., Sieben C., Hartel A., Eisenach C., Thiel G., Blatt M.R. Abscisic acid triggers the endocytosis of the *Arabidopsis* KAT1 K⁺ channel and its recycling to the plasma membrane // *Curr. Biol*. 2007. V. 17. P. 1396.
 23. Mulet J.M., Llopis-Torregrosa V., Primo C., Marques M.C., Yenush L. Endocytic regulation of alkali metal transport proteins in mammals, yeast and plants // *Curr. Genet*. 2013. V. 59. P. 207.
 24. Cui Y., Shen J., Gao C., Zhuang X., Wang J., Jiang L. Biogenesis of plant prevacuolar multivesicular bodies // *Mol. Plant*. 2016. V. 9. P. 774.
 25. Zhuang X., Cui Y., Gao C., Jiang L. Endocytic and autophagic pathways crosstalk in plants // *Curr. Opin. Plant Biol*. 2015. V. 28. P. 39.
 26. Ito Y., Toyooka K., Fujimoto M., Ueda T., Uemura T., Nakano A. The trans-Golgi network and the Golgi stacks behave independently during regeneration after Brefeldin A treatment in tobacco BY-2 cells // *Plant Cell Physiol*. 2017. V. 58. P. 811.
 27. Liu Y., Xiong Y., Bassham D.C. Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants // *Autophagy*. 2009. V. 5. P. 954.
 28. Minibayeva F., Dmitrieva S., Ponomareva A., Ryabovol V. Oxidative stress – induced autophagy in plants: The role of mitochondria // *Plant Physiol. Biochem*. 2012. V. 59. P. 11.
 29. Rine J. Gene overexpression in studies of *Saccharomyces cerevisiae* // *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. Methods in Enzymology.* / Academic Press, 1991. V. 194 P. 239.
 30. Dascher C., Ossig R., Gallwitz D., Schmitt H.D. Identification and structure of four yeast genes (*SLY*) that are able to suppress the functional loss of *YPT1*, a member of the RAS superfamily // *Mol. Cell. Biol*. 1991. V. 11 P. 87.

**ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ ДВУХ ТОКСИКОГЕННЫХ ВИДОВ Bacillariophyta:
Pseudo-nitzschia calliantha Lundholm, Moestrup et Hasle И *P. pungens*
(Grunow ex P.T. Cleve) Hasle**

© 2022 г. С. Л. Полякова^а, *, Н. А. Давидович^а, И. В. Стоник^б, Т. Ю. Орлова^б

^аКарадагская научная станция им. Т. И. Вяземского – природный заповедник Российской академии наук – филиал
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра
“Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского Российской академии наук”, Феодосия, Россия

^бНациональный научный центр морской биологии им. А. В. Жирмунского Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Владивосток, Россия

*e-mail: svielana.poliakova.77@mail.ru

Поступила в редакцию 24.02.2021 г.

После доработки 08.04.2021 г.

Принята к публикации 08.04.2021 г.

Работа посвящена изучению особенностей жизненного цикла потенциально токсикогенных диатомовых водорослей *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup et Hasle и *P. pungens* (Grunow ex P.T. Cleve) Hasle, обитающих в Черном море. Изучена скорость уменьшения длины клеток при содержании в культуре. Установлена продолжительность жизненного цикла и критическая граница размеров, определяющая переход из одной фазы жизненного цикла в другую. Рассчитана продолжительность дорепродуктивной фазы. Показано изменение длины клеток *P. calliantha* от 147 мкм у самых крупных инициальных клеток в начале жизненного цикла до 21 мкм у предельно измельчавших, что позволило расширить ранее известные границы диапазона размеров, характерных для вида. Для *P. calliantha* показано отсутствие зависимости размера инициальных клеток от размера родительских.

Ключевые слова: *Pseudo-nitzschia*, диатомовые, токсикогенные виды, клоновые культуры, размер, жизненный цикл, “цветение”

DOI: 10.31857/S0015330321060154

ВВЕДЕНИЕ

Диатомовые водоросли представлены большим количеством видов, порядка 100 тысяч [1]. Важным этапом в жизни диатомовых является половая репродукция, необходимая для сохранения вида [2]. При этом следует заметить, что жизненный цикл подавляющего большинства остается неизученным, хотя именно он обуславливает развитие природных популяций, в том числе предопределяет, предположительно, периоды массового развития (“цветения”). В Мировом океане широко распространены представители рода *Pseudo-nitzschia* Н.Регалло. Отдельные виды этого рода способны продуцировать токсичную домоевую кислоту. В период “цветения” этот нейротоксин, накапливаясь в тканях моллюсков, передается по пищевым цепям [3], вызывая амнезийное отравление [4–6]. Для Черного моря указано семь потенциально опасных видов *Pseudo-nitzschia* [7], некоторые встречаются в планктоне в прибрежной зоне вблизи Карадага (юго-восточное побережье Крымского полуострова). В пробах нам чаще всего попадались *P. pungens* (Grunow ex Cleve) Hasle и *P. calliantha*

Lundholm, Moestrup et Hasle. Если вид *P. pungens* известен с начала прошлого века (он выбран в качестве типового для рода *Pseudo-nitzschia*), то название *P. calliantha* появилось не так давно. В 2003 году была опубликована статья, описывающая новый вид [8], показано, что он встречается в Черном море у берегов Турции [9]. Однако первые данные о половом воспроизведении и отдельных элементах жизненного цикла этого вида (под другим названием) были получены задолго до этого [10]. О половом воспроизведении *P. pungens* стало известно позднее [11]. Сегодня мы имеем достаточно полное представление о жизненных циклах диатомовых водорослей [11–16], и это позволяет при наличии фактического материала анализировать состояние их популяций. Задача данной работы состояла в изучении особенностей жизненного цикла, его продолжительности, минимальных и максимальных размеров клеток характерных для *P. calliantha* и *P. pungens*, клоны которых были выделены из планктонных проб, отобранных у берегов Крымского полуострова.

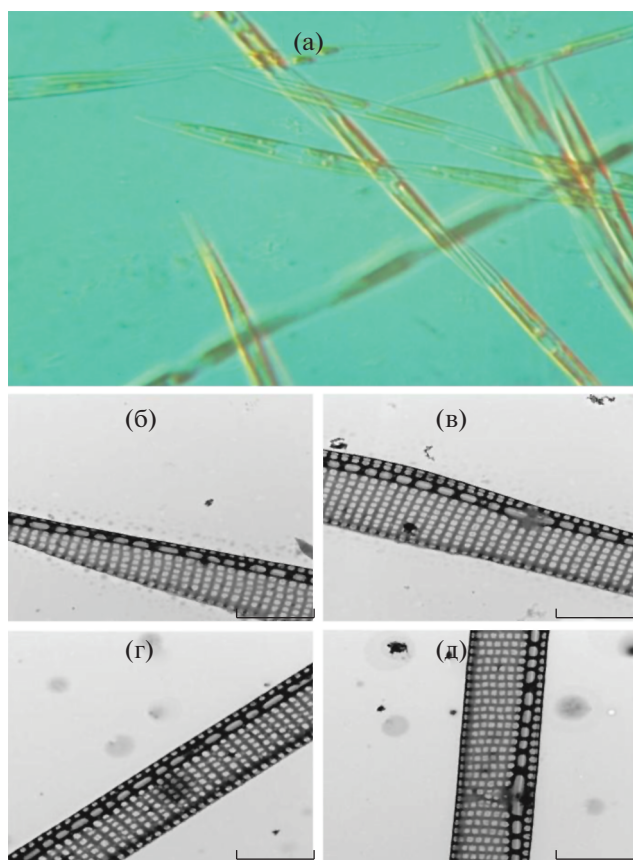


Рис. 1. *Pseudo-nitzschia* cf. *calliantha* Lundholm, Moestrup et Hasle, клетки клона 8.0123-G. (а) – общий вид клеток, (б–д) – фрагменты створок, показывающие фибулы и штрихи; (а) – световая микроскопия, (б–д) – трансмиссионная электронная микроскопия. Масштаб линейки – 2 мкм.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись планктонные пеннатные диатомовые водоросли рода *Pseudo-nitzschia* Н. Peragallo, 1900: *P. calliantha* Lundholm, Moestrup et Hasle (рис. 1) и *P. pungens* (Grunow ex Cleve) Hasle (рис. 2). Отбор проб проводили в нескольких местах вдоль восточного, юго-восточного и юго-западного побережья Крыма: Керченский пролив (г. Керчь), восточная оконечность мыса Опук, Карадагская бухта, бухта Ласпи, Севастопольская бухта (Графская пристань), Каламитский залив (вблизи г. Евпатория), оз. Донузлав (рис. 3). Для отбора проб использовали малую планктонную сеть Джеджи. Диаметр входного отверстия сети – 25 см, ячея газ-сита, изготовленного из синтетических нитей, – 74 мкм (ГОСТ 4403-91, ЗАО “Рахмановский шелковый комбинат”, Россия). Микропипеточным способом [17] с использованием инвертированных оптических микроскопов Nib-100 и Bif-100 (Biobase, Китай) из проб выделены одиночные клетки и введены в клоновые культуры. Измерение разме-

ров клеток производили на микроскопе Biolar PI (PZO, Польша) с помощью окулярной линейки, калиброванной по объект-микрометру. Фотографии сделаны при помощи микроскопа NIB-100 и фотокамеры Canon PoverShort A95. Электронные фотографии панцирей получены с помощью трансмиссионного электронного микроскопа (ТЭМ) Carl Zeiss LIBRA-120 (Carl Zeiss Group, Германия). Фотографии использованы для биометрических измерений и для определения видов, встречающихся в исследуемых районах. Постоянные препараты панцирей, залитые высокопреломляющей средой, готовили, используя упрощенный метод [13], при котором живые клетки культуры выдерживали в дистиллированной воде до разрушения содержимого клеток, затем панцири заливали этанолом, используя капиллярную пипетку, переносили на покровное стекло и поджигали. Повторяли манипуляцию с новой порцией. Очищенные панцири заключали в высокопреломляющую смолу Naphrax (Naphrax Ltd. United Kingdom). Культуры содержали в стеклянных чашках Петри диаметром 10 см и колбах Эрленмейера объемом 100 мл в изолированном помещении с постоянной температурой $20 \pm 2^\circ\text{C}$ и естественном освещении от окон с северной стороны. Для смешанных посевов использовали чашки Петри диаметром 5 см. В качестве культуральной среды применяли модифицированную искусственную среду ESAW [18]. Пересев в свежую среду осуществлялся с периодичностью 10 дней. Зависимость длины клеток от времени содержания в культуре и размера инициальных клеток от размера родительских аппроксимировали линейным уравнением вида:

$$y = a - b \times x, \quad (1)$$

где y – длина клеток; x – дата; a , b – коэффициенты.

Методом наименьших квадратов [19] были рассчитаны значения коэффициента b уравнения, показывающего скорость уменьшения размеров клеток. В таблицах и тексте средние значения приводятся с указанием ошибки среднего и количества измерений (n).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изученные клоны *Pseudo-nitzschia* проявили способность к гетероталлическому половому воспроизведению. За период наблюдений, с августа 2017 года по настоящее время, внутрикловое (гомоталлическое) воспроизведение не отмечалось. В ходе экспериментов по скрещиванию клонов, выделенных из локальных природных популяций, у *Pseudo-nitzschia calliantha* наиболее сексуально активными оказались клоны 8.0123-E, 8.0123-G, 7.0804-L и 7.0804-Si5; у *P. pungens* – 8.0123-D и 7.1023-A (табл. 1). Продемонстрировано отсутствие межвидовой гибридизации.

Таблица 1. Репродуктивная совместимость клонов *Pseudo-nitzschia calliantha* и *P. pungens*, выделенных из локальных природных популяций у побережья Крымского полуострова.

Место отбора проб	Клон	Пол морфологический/поведенческий	<i>P. calliantha</i>						<i>P. pungens</i>									
			8.0123-Е	8.0123-Г	7.0804-Т	7.0806-А	7.0804-Н	7.0804-Р	7.0804-Сi5	8.0822-Н	8.0123-Д	8.0111-А	8.0111-В	7.1018-В	7.1018-Т	7.1023-В	7.1023-А	7.0806-У
<i>P. calliantha</i>	оз. Донузлав	8.0123-Е F	mt2	mt2	mt1	mt1	mt1	mt1	mt1	mt1	mt1	mt1	mt1	mt1	mt1	mt1	mt1	mt1
	оз. Донузлав	8.0123-Г M	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	б. Лисья	7.0804-Л M	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	б. Актинометрическая	7.0806-А M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	б. Коктебель	7.0804-Н M	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	б. Львиная	7.0804-Р M	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	б. Львиная	7.0804-Сi5 F	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	оз. Донузлав	8.0822-Н F	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
<i>P. pungens</i>	оз. Донузлав	8.0123-Д	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Севастополь	8.0111-А	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Севастополь	8.0111-В	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Керчь	7.1018-В	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Керчь	7.1018-Т	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Керчь	7.1023-В	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Керчь	7.1023-А	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	б. Биостанция*	7.0806-У	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Примечание: цифры обозначают балльную оценку (в градациях 0, 1, 2, 3) интенсивности аукоспороборазования в смешанных посевах; mt* – тип скрещивания (mating); прочерк (–) – нет данных.

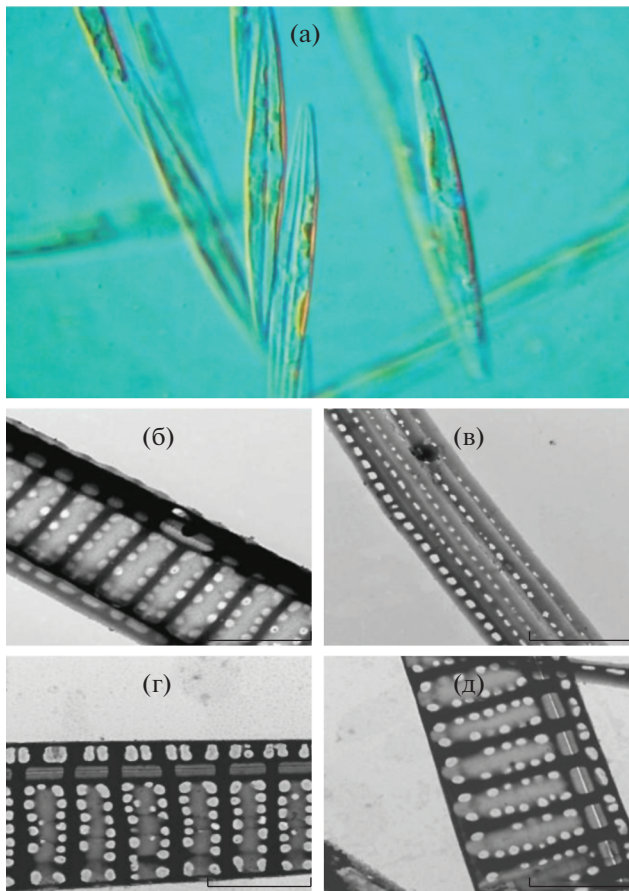


Рис. 2. *Pseudo-nitzschia pungens* (Grunow ex Cleve) Hasle, клетки клона 7.1023-A. (а) – общий вид клеток, (б–д) – фрагменты створок, показывающие фибулы и штрихи, (в) – фрагмент поясковых ободков; (а) – световая микроскопия, (б–д) – трансмиссионная электронная микроскопия. Масштаб линейки – 2 мкм.

Данные, полученные в ходе наблюдения за уменьшением апикальной длины клеток в клонах, позволили расширить диапазон размерных характеристик вида *P. calliantha*. С 20.05.2018 по 16.01.2019 были измерены 153 инициальные клетки, полученные в процессе межклонового полового воспроизведения. В весенне-летний период в смешанных посевах репродуктивно совместимых клонов была измерена самая длинная инициальная клетка (147 мкм). Среднее значение размера инициальных клеток в этот период – 130.5 ± 1.0 мкм ($n = 143$). При этом длина родительских клеток в среднем составила 61.4 ± 1.4 мкм ($n = 100$). В процессе скрещивания зимой отмечен минимальный размер инициальных клеток – 119 мкм, среднее значение – 125.1 ± 4.3 мкм ($n = 10$). Длина родительских клеток изменилась и составила в среднем 47.7 ± 2.3 мкм ($n = 60$). При этом у *P. calliantha* отсутствует значимая корреляция между размером инициальных и родительских клеток (рис. 4).

Во всех выделенных черноморских клонах, сохранившихся в культурах, происходило постепенное равномерное уменьшение апикальной длины клеток (рис. 5). Полученные данные позволили оценить скорость уменьшения размеров клеток при содержании в заданных условиях (табл. 2). Наименьшего размера (21 мкм) достигли клетки клона 7.0804-D5, которые продолжали делиться вегетативно, но уже потеряли способность воспроизводиться половым путем. Культуры, достигавшие этого размера, погибали независимо от условий содержания.

В природной популяции самая крупная клетка вида, который нами был идентифицирован на основании морфологических признаков как *P. calliantha* [20], была найдена в марте 2020 года. Ее длина составила 157 мкм. Средний размер инициальных клеток был равен 136.7 ± 7.4 ($n = 44$) мкм. Длина родительских клеток лежала в диапазоне 66–91 мкм, среднее значение длины – 83.6 ± 6.3 мкм ($n = 81$).

Принимая в расчет установленные в лабораторных условиях кардинальные размеры клеток и скорость уменьшения размеров, рассчитали продолжительность дорепродуктивной фазы и всего жизненного цикла, которые составили 12 и 35 мес. (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее уже была отмечена способность рода *Pseudo-nitzschia* к гетероталлическому половому воспроизведению [10]. Применяя биологическую концепцию вида, утверждающую, что “виды представляют собой группы фактически или потенциально скрещивающихся природных популяций, которые репродуктивно изолированы от других таких групп” [21], мы можем определить видовые границы большинства гетероталлически воспроизводимых диатомовых водорослей. В конце 90-х годов XX столетия из Черноморской природной популяции в районе Карадага были выделены и введены в культуру клоны *Pseudo-nitzschia*, на тот момент идентифицированные как *P. pseudodelicatissima*. Попытки скрещивания выделенных клонов с другими, принадлежащими к этому виду, результатов не дали [10]. Это инициировало описание нового вида *P. calliantha* Lundholm, Moestrup et Hasle [8].

Изучение размерных характеристик *P. calliantha* показало вариабельность границ, от 40 до 110 мкм [8, 22, 23]. Следует заметить, что эти данные были получены на природных популяциях, и вероятнее всего, не отражают изменения размеров во всем жизненном цикле, поскольку при изучении природных популяций в большинстве случаев обычно не удается установить максимальные видоспецифические размеры в силу редкости событий ауксоспорообразования и связанной с этим



Рис. 3. Станции отбора проб вдоль побережья Крымского полуострова: Керченский пролив (г. Керчь), восточная оконечность мыса Опук, Карадагская бухта, бухта Ласпи, Севастопольская бухта (Графская пристань), Каламитский залив (вблизи г. Евпатория), озеро Донузлав.

сложности обнаружения инициальных клеток. В лабораторных условиях, напротив, можно инициировать половой процесс с появлением инициальных клеток, самых крупных, находящихся в начале жизненного цикла, и определить клетки минимального жизнеспособного размера. Данные, полученные нами в лабораторных условиях, позволили существенно расширить известный диапазон размеров, до 21–147 мкм. Примечательно, что в природной популяции были найдены клетки еще большего размера. Однако идентификация вида в этом случае производилась на основании световой микроскопии в прижизненном состоянии, что могло привести к неточности определения вида.

Границей перехода к репродуктивной фазе стало уменьшение клеток предыдущей генерации до 60–70% от максимально видоспецифического размера [25]. Ранее уже была отмечена граница перехода в 63–70% для других видов *Pseudo-nitzschia* [2, 26]. У представителей этого рода критическая граница, таким образом, выше, чем у большинства изученных диатомовых [27]. Следовательно, продолжительность дорепродуктивной фазы оказывается существенно более короткой.

Согласно полученным нами данным дорепродуктивная фаза для *P. calliantha* составляет приблизительно 12 мес. (табл. 3). Если использовать данные о максимальной длине клеток и значения кардинального размера, обуславливающего пере-

ход из дорепродуктивной в репродуктивную фазу, известные из литературных источников, то продолжительность дорепродуктивной фазы у *P. calliantha* и *P. pungens* должна составить 15 и 14 мес., а всего жизненного цикла – 18.5 и 19 мес. соответственно.

Заметим, что продолжительность отдельных фаз зависит от скорости уменьшения размера клеток, которая в свою очередь определяется толщиной панциря и темпом вегетативного деления [13]. Отмеченная нами разница в скорости уменьше-

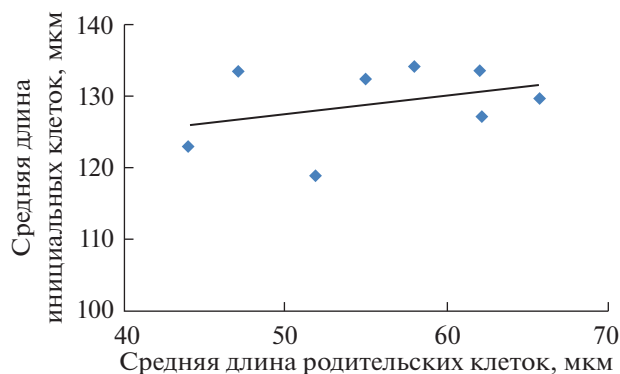


Рис. 4. Зависимость размера инициальных клеток в смешанных посевах клоновых культур *Pseudo-nitzschia calliantha* от родительских.

Таблица 2. Скорость уменьшения длины клеток *Pseudo-nitzschia calliantha* и *P. pungens* при содержании в клоновых культурах

Станция отбора	Клон	Скорость уменьшения длины клеток, мкм	
		день ⁻¹	мес. ⁻¹
<i>Pseudo-nitzschia calliantha</i>			
оз. Донузлав	8.0123-E	0.12 ± 0.04 (n = 8)	3.7 ± 1.2
оз. Донузлав	8.0123-G	0.11 ± 0.03 (n = 7)	3.4 ± 0.9
б. Львиная	7.0804-D5	0.12 ± 0.04 (n = 8)	3.7 ± 1.2
б. Львиная	7.0804-Si5	0.11 ± 0.04 (n = 9)	3.4 ± 0.9
б. Коктебель	7.0804-N	0.14 ± 0.05 (n = 8)	4.3 ± 1.5
б. Лисья	7.0804-F	0.12 ± 0.04 (n = 5)	3.7 ± 1.2
	Средняя	0.12 ± 0.01 (n = 45)	3.7 ± 0.3
	Минимальная	0.11	3.4
	Максимальная	0.14	4.3
<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>			
оз. Донузлав	8.0123-D	0.20 ± 0.01 (n = 8)	6.1 ± 0.3
оз. Донузлав	8.0123-C	0.26 ± 0.07 (n = 6)	7.9 ± 2.1
Керчь	7.1018-B	0.16 ± 0.05 (n = 8)	4.9 ± 1.5
Керчь	7.1018-C	0.20 ± 0.04 (n = 5)	6.1 ± 0.9
Керчь	7.1018-T	0.20 ± 0.05 (n = 6)	6.1 ± 1.5
Керчь	7.1023-A	0.15 ± 0.04 (n = 5)	4.6 ± 0.9
	Средняя	0.20 ± 0.02 (n = 38)	6.0 ± 0.6
	Минимальная	0.15	4.6
	Максимальная	0.26	7.9

Таблица 3. Расчетная продолжительность дорепродуктивной фазы и всей продолжительности жизненного цикла у *Pseudo-nitzschia calliantha* и *P. pungens*

Вид	Длина клеток, мкм		Источник данных	Граница перехода в репродуктивную фазу, мкм	Расчетная продолжительность, дни (мес.)	
	минимальная	максимальная			дорепродуктивной фазы	всего жизненного цикла
<i>P. calliantha</i>	40	110	[22, 23]	55*	(110 – 55)/0.12 ≈ ≈458 (15)	(110 – 40)/0.12 ≈ ≈583 (19)
	21	147	Настоящая работа	103**	(147 – 102.9)/0.12 ≈ ≈368 (12)	(147 – 21)/0.12 ≈ ≈1050 (35)
<i>P. pungens</i>	61	174	[24]	87*	(174 – 87)/0.20 ≈ ≈435 (14)	(174 – 61)/0.20 ≈ ≈565 (18.5)

Примечание: * – расчетное значение; ** – по фактически полученным нами данным.

ния длины клеток *Pseudo-nitzschia pungens* и *P. calliantha*, по нашему мнению, связана в первую очередь с толщиной панциря в зоне перекрытия эпитеки и гипотеки, а не темпом деления.

P. calliantha, как и другие представители рода [28], имеет выраженный сезонный цикл развития. Мониторинг динамики численности в Карадагской бухте показал, что максимумы приходились на ранневесенний (март–апрель) и позднелетний

(август–сентябрь) периоды. Массовое развитие, по-видимому, является необходимым условием для успешного полового воспроизведения, поскольку вероятность слияния гамет в трехмерном пространстве возрастает при большой численности [10].

Таким образом, представленные нами размерные характеристики позволяют не только уточнить диагноз вида *P. calliantha*, имеющего важное

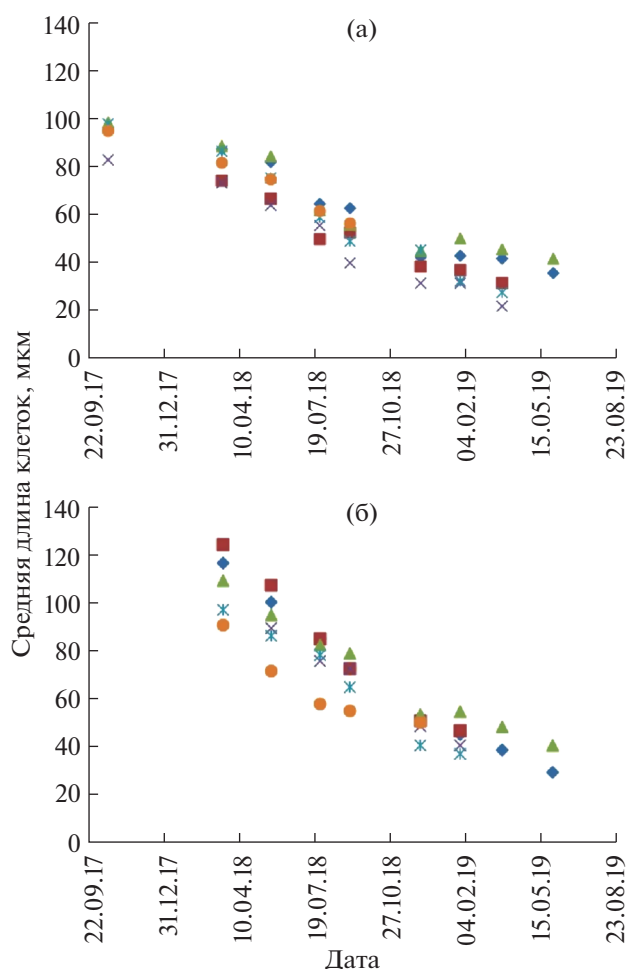


Рис. 5. Изменение длины клеток (а) *Pseudo-nitzschia calliantha* (клоны: 8.0123-Е, 8.0123-Г, 7.0804-Si5, 7.0804-D5, 7.0804-N, 7.0804-F) и (б) *P. pungens* (клоны: 8.0123-D, 8.0123-C, 7.1018-B, 7.1018-C, 7.1018-T, 7.1023-A) при содержании в культуре (среда ESAW) в условиях постоянной температуры $20 \pm 2^\circ\text{C}$ при естественном освещении со стороны северного окна.

практическое значение с точки зрения токсикогенности, но и дают дополнительную информацию для понимания закономерностей протекания жизненного цикла, анализа природных популяций, моделирования динамики численности.

Работа выполнена в рамках госзадания Карадагской научной станции им. Т. И. Вяземского – природного заповедника Российской академии наук – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра “Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского Российской академии наук” – “Изучение фундаментальных физических, физиолого-биохимических, репродуктивных, популяционных и поведенческих характеристик морских гидробионтов”, номер гос. регистрации 121032300019-0. Электронные фотогра-

фии диатомей получены в Центре коллективного пользования “Дальневосточный центр электронной микроскопии” Национальный научный центр морской биологии им. А. В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mann D.G., Vanormelingen P. An inordinate fondness? The number, distributions and origins of diatom species // J. Eukaryotic Microbiol. 2013. V. 60. P. 414. <https://doi.org/10.1111/jeu.12047>
2. Bates S.S., Davidovich N.A. Factors affecting the sexual reproduction of diatoms, with emphasis on *Pseudo-nitzschia* spp. // Harmful marine algal blooms. Proc. of the sixth international conference on toxic marine phytoplankton / Eds. Lasso P., Arzul G., Erard E., Gentien P., Marcaillou C. Nantes, France: Technique et documentation. Lavoisier, Intercept Ltd, 1995. P. 31.
3. Bates S.S. Toxic phytoplankton on the Canadian east coast: implications for aquaculture // Bull. Aquacult. Assoc. Canada. 1997. V. 3. P. 9.
4. Montresor M., Vitale L., D’Alelio D., Ferrante M.I. Sex in marine planktonic diatoms: insights and challenges // Perspectives in Phycology. 2016. V. 3. P. 61. <https://doi.org/10.1127/pip/2016/0045>
5. Wright J.L.C., Quilliam M.A. Methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisons // Manual on harmful microalgae / Eds. Hallegraeff G.M., Anderson D.M., Cembella A.D. IOC Manual and Guides № 33: UNESCO, 1995. P. 113.
6. Rhodes L., White D., Syhre M., Atkinson M. *Pseudo-nitzschia* species isolated from New Zealand coastal waters: domoic acid production in vitro and links to shellfish toxicity // Harmful and toxic algal blooms / Eds. Yasumoto T., Oshima Y., Fukuyo Y. Paris: IOC of UNESCO, 1996. P. 155.
7. Рябушко Л.И., Besiktepe S., Ediger D., Илмаз Д., Зенгинер А., Рябушко В.И., Лу Р.И. Токсичная диатомовая водоросль *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup et Hasle из Черного моря: морфология, таксономия, экология // Морской экологический журнал. 2008. Т. 7. С. 51. <https://doi.org/10.2478/v10279-012-0004-8>
8. Lundholm N., Moestrup Ø., Hasle G.R., Hoef Emden K. A study of the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* / *cuspidata* complex (Bacillariophyceae): what is *P. pseudodelicatissima*? // J. Phycol. 2003. V. 39. P. 797. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2003.02031.x>
9. Barga S., Koray T., Lundholm N. First report of *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup et Hasle 2003, a new potentially toxic species from Turkish coasts // E.U. Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 2002. V. 19. P. 479. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2011.01.002>
10. Davidovich N.A., Bates S.S. Sexual reproduction in the pennate diatoms *Pseudo-nitzschia multiseries* and *P. pseudodelicatissima* (Bacillariophyceae) // J. Phycol.

1998. V. 34. P. 126.
<https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1998.340126.x>
11. *Chepurnov V.A., Mann D.G., Sabbe K., Vannerum K., Casteleyn G., Verleyen I., Peperzak L., Vyverman W.* Sexual reproduction, mating system, chloroplast dynamics and abrupt cell size reduction in *Pseudo-nitzschia pungens* from the North Sea (Bacillariophyta) // *Eur. J. Phycol.* 2005. V 40. P. 379.
<https://doi.org/10.1080/09670260500254735>
 12. *Round F.E., Crawford R.M., Mann D.G.* The Diatoms. Biology and Morphology of the Genera. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. 747 p.
 13. *Роцин А.М.* Жизненные циклы диатомовых водорослей. Киев: Наукова думка, 1994. 171 с.
 14. *Mann D.G.* Size and Sex // *The Diatom World, Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology* / Eds. Seckbach J., Kociolek J.P. New York: Springer Science + Business Media, 2011. P. 145.
https://doi.org/10.1007/978-94-007-1327-7_6
 15. *Davidovich N.A., Davidovich O.I., Podunai Yu. A., Shorenko K.I., Kulikovskiy M.S.* Reproductive properties of diatoms significant for their cultivation and biotechnology // *Russ. J. Plant Physiol.* 2015. V. 62. P. 153.
 16. *Pouličková A., Mann D.G.* Diatom sexual reproduction and life cycles // *Diatoms: Fundamentals and Applications* / Eds. Seckbach J., Gordon R. USA, Beverly, Massachusetts: Scrivener Publishing LLC, 2019. P. 245.
<https://doi.org/10.1002/9781119370741>
 17. *Andersen R.A., Berges J.A., Harrison P.J., Watanabe M.M.* Algal culturing techniques // London: Elsevier Academic Press, 2005. 578 p.
 18. *Полякова С.Л., Давидович О.И., Подунай Ю.А., Давидович Н.А.* Модификация среды ESAW, используемой для культивирования морских диатомовых водорослей // *Морской биологический журнал.* 2018. Т. 3. С. 73.
<https://doi.org/10.21072/mbj.2018.03.2.06>
 19. *Рокицкий П.Ф.* Биологическая статистика. Минск: Высшейш. школа, 1973. 320 с.
 20. *Gogorev R.M., Chudaev D.A., Stepanova V.A., Kulikovskiy M.S.* Russian and English terminological glossary on morphology of diatoms // *Novosti sistematiki nizshikh rastenii.* 2018. V. 52. P. 265.
 21. *Mayr E.* Systematics and the Origin of Species from the Viewpoint of a Zoologist. New York: Columbia University Press, 1942. 372 p.
 22. *Cusack C., Raine R., Patching J.W.* Occurrence of Species from the Genus *Pseudo-nitzschia* Peragallo in Irish Waters // *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy*, 2004. V. 104. P. 55.
<https://doi.org/10.3318/BIOE.2004.104.1.55>
 23. *Caroppo C., Congestri R., Bracchini L., Albertano P.* On the presence of *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup et Hasle and *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Cleve) Heiden in the Southern Adriatic Sea (Mediterranean Sea, Italy) // *J. Plankton Res.* 2005. V. 27. P. 763.
<https://doi.org/10.1093/plankt/fbi050>
 24. *Bates S.S., Hiltz M.F., Léger C.* Domoic acid toxicity of large new cells of *Pseudo-nitzschia multiseries* resulting from sexual reproduction // *Proceedings of the Sixth Canadian Workshop on Harmful Marine Algae* / Eds. Martin J.L., Haya K. New Brunswick, Canada: Fisheries and Oceans Canada, 1999. V. 2261. P. 21.
 25. *Полякова С.Л., Давидович Н.А.* Положение верхней границы репродуктивной фазы у представителей рода *Pseudo-nitzschia* // *Материалы II Международной научно-практической конференции “Биологическое разнообразие: изучение, сохранение, восстановление, рациональное использование”.* Керчь, 2020. С. 51.
 26. *Hiltz M., Bates S.S., Kaczmarska I.* Effect of light: dark cycles and cell apical length on the sexual reproduction of the pennate diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* (Bacillariophyceae) in culture // *Phycologia.* 2000. V. 39. P. 59.
<https://doi.org/10.2216/i0031-8884-39-1-59.1>
 27. *Davidovich N.A.* Species-specific sizes and size range of sexual reproduction in diatoms // *Proc. 16th International Diatom Symposium.* Athens and Aegean Islands, 2000.
 28. *Congestri R., Polizzano S., Albertano P.* Toxic *Pseudo-nitzschia* Populations from the Middle Tyrrhenian Sea (Mediterranean Sea, Italy) // *Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection*, Chapter in NATO Security through Science Series A: Chemistry and Biology. 2008. P. 197. <https://doi.org/>
https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8480-5_7