

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 68, номер 1, 2021

---

---

## ОБЗОРЫ

- Эндосимбиотическое происхождение хлоропластов в эволюции растительной клетки  
*И. Н. Стадничук, В. В. Кузнецов* 3
- Растительные экспрессионные системы – новый этап в производстве биофармацевтических препаратов  
*А. А. Загорская, Е. В. Дейнеко* 20
- Молекулярно-генетический анализ биосинтеза натурального каучука  
*А. Ю. Америк, Ю. Ц. Мартиросян, Л. Ю. Мартиросян,  
В. М. Гольдберг, К. Р. Утеулин, С. Д. Варфоломеев* 36
- 

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Различия в проявлении плюрипотентности клеток *in vivo* и *in vitro* у мутанта *Arabidopsis thaliana* с фенотипом нарушения клеточной памяти  
*Е. В. Куприянова, Е. Р. Денисова, М. А. Байер, Т. А. Ежова* 53
- Сравнение редокс-состояния аскорбиновой кислоты и аскорбатоксидазной активности у вакуолей и лейкопластов клеток корнеплодов столовой свеклы в период физиологического покоя  
*Е. В. Прадедова, О. Д. Нимаева, Н. В. Семенова, Р. К. Салаяев* 63
- Оценка содержания витамина С и экспрессии гена ГДФ-Л-галактозофосфорилазы (*VTС2*) у сортов лука-поррея (*Allium porrum* L.)  
*О. К. Анисимова, Т. М. Середин, А. В. Щенникова, Е. З. Кочиева, М. А. Филюшин* 75
- Жирнокислотный состав фракций суммарных липидов почек растений рода *Betula* L. по фазам распускания  
*И. В. Морозова, Н. П. Чернобровкина, М. К. Ильинова, Е. В. Робонен,  
В. Д. Цыдендамбаев, В. П. Пчёлкин* 85
- Индукция САМ-фотосинтеза у *Hylotelephium triphyllum* (Нав.) Holub (*Crassulaceae*) в условиях европейского Северо-Востока России  
*Т. К. Головки, И. Г. Захожий, Г. Н. Табаленкова* 93
- Рост культуры *Porphyridium purpureum* (Porphyridiales, Rhodophyta) и продукция В-фикоэритрина при различной освещенности  
*И. Н. Гудвилович, А. С. Лелеков, Е. И. Мальцев, М. С. Куликовский, А. Б. Боровков* 103
- 
-



УДК 581.1

## ЭНДОСИМБИОТИЧЕСКОЕ ПРОИСХОЖДЕНИЕ ХЛОРОПЛАСТОВ В ЭВОЛЮЦИИ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

© 2021 г. И. Н. Стадничук<sup>а</sup>, \*, В. В. Кузнецов<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

\*e-mail: stadnichuk@mail.ru

Поступила в редакцию 16.06.2020 г.

После доработки 16.06.2020 г.

Принята к публикации 18.06.2020 г.

Теория эндосимбиотического происхождения хлоропластов стала базовой для современной биологии. Установлено возникновение эукариотного фотосинтеза в результате фагоцитарного приобретения цианобактерий предковой эукариотной клеткой. Феномен эндосимбиоза неотделим от теории клеточной эволюции. Среди решающих факторов биологического прогресса, приведших к разнообразию и огромной сложности эукариотных организмов, лежит процесс эндосимбиогенеза. Современная эволюционная теория строится на объединении феномена эндосимбиоза, параллельного переноса генов, теории естественного отбора и данных филогеномики. Эукариогенез объединил в клетках разные надмолекулярные комплексы, создал разнообразие органелл, привел к оксигенации биосферы и современному многообразию форм жизни.

**Ключевые слова:** пластиды, хлоропласты, цианобактерии, эволюция, эндосимбиоз

**DOI:** 10.31857/S0015330321010176

### ВВЕДЕНИЕ

Теория симбиогенеза хлоропластов [1] стала крупнейшим достижением отечественной и мировой биологии XX века и легла в основу современных представлений об эволюции клетки. Древность происхождения цианобактерий, установленная палеомикробиологией и палеогеологией ( $\geq 2.5$  млрд. лет), сходство в строении фотосинтетического аппарата и молекулярном механизме осуществления фотосинтеза с хлоропластами, безоговорочно подтвердили теорию. Данные молекулярной биологии и геносистематики пластид раскрыли последовательность эволюционных событий. Установлено происхождение двух-, трех- и четырех-мембранных хлоропластов как следствие первичного и вторичного эндосимбиозов. Обнаружены третичный и сериальный первичный эндосимбиозы микроводорослей и транзиторные симбиозы водорослей с протистами и беспозвоночными животными. Установлена передача большинства пластидных генов в ядерный геном клеток-хозяев и зафиксирован латеральный перенос генов от хлоропластов к митохондриям. Найдено объяснение присутствия в растительном мире нескольких пигментных линий пластид. Создание раздельной геносистематики ядерных и пластидных геномов,

синхронизация биосинтеза белков на рибосомах цитоплазмы и хлоропластов, молекулярные механизмы транспорта белковых продуктов из цитоплазмы в хлоропласт с помощью транзиторных и сигнальных пептидов являются предметом современных исследований. Возникла новая биологическая дисциплина – симбиогенетика.

### ВОЗНИКНОВЕНИЕ ТЕОРИИ

*Аккумуляция биологических знаний,  
предшествовавших теории эндосимбиоза*

Активное становление естественных наук, включая биологию, началось со второй половины XVIII века. Многие из биологических открытий и обобщений оказались впоследствии связаны с теорией эндосимбиоза. В 1771 г. Д. Пристли открыл фотосинтез, а в 1779 г. Я. Ингенхаузом было показано, что для протекания фотосинтеза необходим свет. В 1817 г. Ж. Пельте и Ж. Каванту обнаружили хлорофилл *a* – основной пигмент фотосинтеза. В 1824–1825 г.г. сине-зеленые водоросли (прежнее название цианобактерий) были включены как самостоятельная группа в ботаническую номенклатуру. В 1881–1884 г.г. Т.В. Энгельману удалось доказать, что сине-зеленые водоросли, подобно растениям, осуществляют фотосинтез. В 1883 г. А. Шимпер и А. Мейер описали “зеленые гранулы” – хлоро-

*Сокращения:* Хл – хлорофилл.

пласты, где локализуется хлорофилл. В 1885 г. А. Шимпер показал, что хлоропласты обладают в клетке бинарным делением, передаваясь из поколения в поколение, и предположив возможность происхождения хлоропластов от цианобактерий. В 1879 г. Г.А. де Бари ввел в биологию термин “симбиоз”. Важным результатом в 1895 г. стало сообщение Р. Лаутерборна об обнаружении зеленой амёбы *Paulinella*. В конце XX века изучение этого одноклеточного сыграло заметную роль как одно из доказательств теории эндосимбиоза.

#### *Положения теории эндосимбиоза К.С. Мережковского*

От эволюционных предположений и эволюционных идей теория отличается тем, что предлагает конкретные движущие силы и факторы эволюции, предоставляя для этого примеры и доказательства. Корректность приводимых положений может быть подвергнута проверке и при их ошибочности отвергнута, а при справедливости — подхвачена и развита. Эволюционные высказывания появились уже у древнегреческих философов. Они не были ложными, но теория эволюции возникла лишь с обоснованием ее ведущего фактора — естественного отбора. К.С. Мережковскому удалось создать теорию эндосимбиоза, опираясь на собственные микроскопические наблюдения над хлоропластами диатомовых водорослей и на обобщение накопленных ранее сведений. Были представлены доказательства происхождения хлоропластов от цианобактерий на основе сходства размеров, внутреннего строения и бинарного деления, идущего одновременно с делением клеточных ядер. Было введено понятие “симбиогенезис”, равнозначное термину “эндосимбиоз”. В качестве основы симбиогенезиса предложена теория двух клеточных плазм, микоплазмы и амёбоплазмы, предвосхитившая разделение живой материи на два царства, про- и эукариотов [1, 2].

#### *Период непризнания*

В 1858 г. “Теория происхождения видов...” Ч. Дарвина сразу после публикации, не обходясь без критики и возражений, вызвала огромный интерес и внимание биологов. Положение о естественном отборе, подкрепляемое новыми данными, завоевало множество сторонников. Иначе сложилась судьба опытов Г. Менделя, результаты которых после опубликования в 1865 г. не привлекли внимания, а датой рождения генетики считается 1900 г. — год повторного открытия менделеевских законов. Теория эндосимбиоза К.С. Мережковского, опубликованная в 1905 г., прошла путь к всеобщему признанию через длительный период критицизма. Хотя симбиоз в качестве биологического феномена был известен, положение о ци-

анобактериях как прародительницах хлоропластов противоречило утвердившимся представлениям о прямой дарвиновской филиации и последовательном накоплении видовых различий на пути усложнения и дивергенции организмов. Происхождение водорослей-эукариотов от сине-зеленых водорослей (цианобактерий), согласно филогенетическим схемам, требовало промежуточного звена в виде праводоросли (*Uralga*), позже названной ботаническим мифом, и поиск которой в дальнейшем не дал результатов. В биологии не признавалось положение о том, что одноклеточный организм может быть проглочен, но лишь частично переварен организмом-хозяином с созданием принципиально новой ветви развития жизни. Теория эндосимбиоза получала критические замечания со стороны крупнейших российских биологов, таких как А.С. Фаминцын, Б.М. Козо-Полянский и А.И. Опарин, которые занимались сопредельными вопросами. Критика была строго научной и апеллировала к неясным частям теории, которые не находили отклика в устоявшихся представлениях, так как эндосимбиоз стал качественно новым уровнем понимания эволюции клетки. В международной литературе публикации К.С. Мережковского предпочитали не замечать (известный популяризатор Л. Маргелис), либо критика оставалась бездоказательной. Дискуссии, сопровождавшие отрицание теории, продолжались более полувека (см. [3, 4] и ссылки).

#### *Возрождение теории*

Отношение к теории эндосимбиоза с появлением данных электронной микроскопии и молекулярной биологии в начале 60-х годов XX века стало быстро меняться на противоположное. Была выявлена двойная мембрана хлоропластов, в них обнаружена кольцевая ДНК, собственные рибосомы и биосинтез белка. Несколько позже появились данные о наличии у микроводорослей трех- и четырехмембранных хлоропластов, что уже было легко интерпретировать как следствие вторичных эволюционных эндосимбиозов (см. обзор работ тех лет [5] и ссылки). В перипластидном пространстве хлоропластов между третьей и четвертой мембранами у криптофитовых водорослей и у зеленой амёбы *Chlororachnion* было найдено редуцированное ядро промежуточного хозяина, названное нуклеоморфом [5]. С начала 80-х годов феномен симбиогенеза, или доместикизации цианобактерий, стал общепризнанным. Молекулярно-биологические данные не оставили ни малейших сомнений в осуществившемся эндосимбиозе [6]. 100-летие создания теории было отмечено переводом основополагающей статьи К.С. Мережковского [1], изданной в 1905 г. на немецком языке, на английский [7]. В отечественной литературе юбилей теории был отмечен

одним эссе [8] и двумя статьями [9, 10] к одной из которых [10] также прилагался полный русский перевод.

### *Происхождение эукариотной клетки*

Эндосимбиоз хлоропластов неотделим от вопроса происхождения клетки. При возрасте Земли в 4.6 млрд. лет клеточная жизнь, согласно изотопному составу углерода в осадочных породах и данным палеобиологии и филогеномики, возникла 3.9–3.6 млрд. лет тому назад [11, 12]. К середине XX века возникло прочное представление о наличии двух клеточных царств, прокариот (бактерии) и эукариот (все остальные организмы). Монофилетическое древо с общим клеточным предком, обозначенным как “ЛУКА” (LUCA, Last Universal common Ancestor) было воссоздано в итоге сравнения гомологии 16S-рРНК современных микроорганизмов [13]. Царство прокариот распалось на подцарства бактерий и архей, а клеточная система организмов разделилась после появления “ЛУКИ” на три ветви, получившие названия бактерий, архей и эукариотов (Bacteria, Archea, Eucarya). Происхождение эукариотов, кардинально отличающихся от двух других фил сложностью строения, осталось наиболее трудным вопросом.

За последние годы метагеномика и геномный анализ единичных клеток вывели филогеномику на новый этап исследований клеточной эволюции. Выяснились широкое распространение архей в природных экосистемах и их способность к кооперативной синтрофии с бактериями вплоть до слияния клеток. Было найдена группа асгардархей, оказавшихся в процессах репликации, транскрипции и трансляции ближе к эукариотам, чем к другим археям и бактериям [14]. Концепция LUCA сменилась представлением о LECA (Last Eukaryotic Common Ancestor), последнем общем предке эукариотов. LECA возник благодаря слиянию предковой археобактериальной клетки, ставшей основой ядерного генома, и  $\alpha$ -бактериальной клетки, ставшей промитохондрией [15, 16]. Поэтому митохондрия является столь же древней компонентой эукариотной клетки, как и ее ядро, а немногие известные в природе безмитохондриальные эукариоты-протисты утратили митохондрии вследствие редуccionной эволюции [17]. Трехдоменная схема “древа жизни” сменилась схемой двух доменов, в которой эукариоты стали вторичным царством [16]. Двухдоменный сценарий пояснял наличие геномного (ядро) и энергетического (митохондрии) компартментов у эукариотной клетки, но оставался малопривлекательным для описания ее сложной внутримембранной организации и автономизации органелл. Противоречия могут быть сняты первичным синтрофным слиянием с третьим партнером —  $\delta$ -эубактериальной клеткой, привносящей свои метаболические

возможности и ставшей основой эукариотной цитоплазмы [18]. Хотя в первичном архейно-бактериальном сообществе были все условия и для синтрофии, и для параллельного переноса генов, реализация подобных событий была крайне маловероятной, и от времени возникновения жизни до появления первых эукариотов прошло не менее 1.5 млрд. лет.

### *Энергетические возможности микроорганизмов*

Источниками энергии для всех клеточных форм являются процессы хемоавто-, фотоавто- и органотрофии. Хемоавтотрофия основана на наиболее простых окислительных процессах и, по общему мнению, появилась ранее фотоавтотрофии, а органотрофы возникли с получением возможности окислять накопленную органику [19, 20]. Фотосинтез возник только в филе Bacteria. Поскольку первичная атмосфера Земли была бескислородной или малоокислородной, первые фотосинтезирующие организмы были анаэробами [21]. Пять из шести известных групп фотобактерий (зеленые нитчатые, зеленые одноклеточные и зеленые серные бактерии, а также пурпурные и гелиобактерии) являются аноксигенами, и лишь одна группа, цианобактерии, стала оксигенными фотосинтетиками [19]. Время их появления, согласно возрасту диметилгопанов — древнейших сланцевых биомаркеров цианобактерий — и возрасту цианобактериальных строматолитов, оценивается в 2.5–2.7 млрд. лет; более древние пласты микрофоссилий относят к зеленым бактериям-анаэробам [20, 21].

Эндосимбиоз хлоропластов мог произойти только после формирования митохондрий. Выигрыш от эндосимбиоза для обоих партнеров является очевидным. Проглоченная цианобактерия смогла улавливать из цитоплазмы клетки-хозяйки часть углекислоты, продуцируемой митохондриями, а митохондрии получали выделяемый при фотосинтезе кислород. Митохондрии, используя  $O_2$ , способствовали выживанию проэукариотов, что стало актуальным после случившейся в биосфере 2.45 млрд. лет назад “Кислородной катастрофы” (Great oxidation event), созданной цианобактериями [22]. Избыточный в малоаэробной клеточной цитоплазме  $O_2$  мог приводить к появлению активных форм кислорода (АФК) и окислительным повреждениям. Хлоропластами были выработаны различные формы нейтрализации АФК, благодаря чему тройная система хлоропласты–цитозоль–митохондрии оказалась устойчивой формой существования.

*Формирование фотосинтеза  
и строение пигментного аппарата*

Все фотосинтетические организмы имеют общие принципы строения пигментного аппарата, в состав которого входят реакционный центр (РЦ), где происходит первичное разделение заряда, пигментная антенна, снабжающая РЦ энергией поглощенных световых квантов, и цепь переноса электрона к конечным акцепторам. Первоначальный РЦ возник у аноксигенных фотобактерий и затем разделился на два типа: в РЦ типа I возбужденный электрон стабилизируется с участием Fe/S-центров, а в РЦ типа II – с участием феофитин/хинонного кластера. Каждая группа аноксигенных фотосинтетиков располагает только одним из вариантов РЦ. Фундаментальным отличием цианобактерий служит объединение в клетке двух РЦ, переименованных в РЦ фотосистемы I (ФС I) и фотосистемы II (ФС II) (рис. 1). Существует несколько возможных сценариев этого ароморфоза, которые ждут дальнейшего рассмотрения [23]. Биологический прогресс оксигенных фотосинтетиков связан с появившейся способностью фотолитерального разложения воды, ставшей донором электронов в Mn-содержащем белковом кластере ФС II. Цепь переноса электрона была унаследована всеми фотосинтетиками от ранее появившихся хемоавтотрофов [19, 20]. Основным пигментом фотосинтеза у цианобактерий и всех эукариотных пластид стал хлорофилл *a*. Пигментами антенны, увеличивающей светопоглощение, в цианобактериях служат фикобилипротеины, собранные в фикобилисомы [24] и замененные у большинства фотосинтезирующих эукариотов на хлорофилл *a/b* или хлорофилл *a/c*-содержащие комплексы [25].

*Фикобилины и O<sub>2</sub> в качестве маркеров эволюции  
оксигенного фотосинтеза*

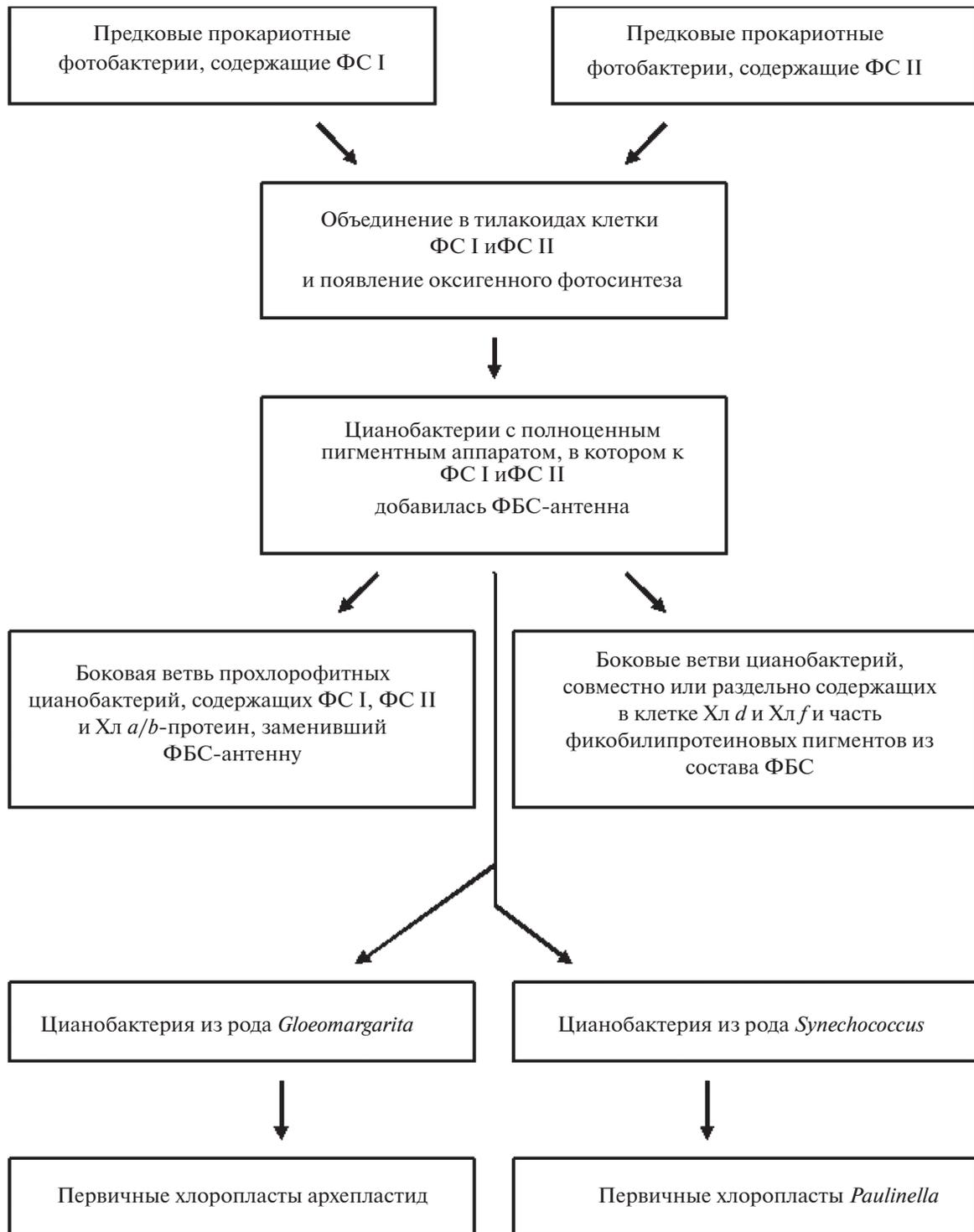
Хлорофиллы и в меньшей степени фикобилины могли бы стать прекрасными пигментными маркерами хронологии фотосинтеза, но продукты их катаболизма не сохраняются в осадочных породах более 10 млн. лет [26]. Вместе с тем, существует известное положение о том, что “последовательность реакций биосинтеза пигментов может являться рекапитуляцией эволюционных событий” [27], что в случае биогенеза фикобилинов предоставляет возможность важных умозаключений. У фикобилинов как хромофоров пигментной антенны цианобактерий цепь биосинтеза вплоть до образования протогема, образующегося из протопорфирина IX благодаря вставке в тетрапиррольное кольцо атома железа, совпадает с путем биосинтеза гемов. Ключевой реакцией синтеза билинов является обратная реакция удаления ставшего ненужным Fe<sup>2+</sup>, происходящая одновременно с размыканием созданной перед тем кольцевой молекулярной структуры и требу-

ющая участия трех молекул O<sub>2</sub> [28]. Приобретенное железо теряется вновь (рис. 2), что служит указанием на то, что геммы как атрибут цитохромов в электрон-транспортных цепях у хемосинтетиков и в дыхательной цепи митохондрий появились ранее антенных пигментов фотосинтеза. Участие кислорода в появившейся реакции биосинтеза также свидетельствует, что к этому моменту уже существовала оксигенация атмосферы за счет деятельности протоцианобактерий, еще не приобретших фикобилипротеиновую антенну. Аналогично, в реакции гидроксилирования хлорофиллида *a* в хлорофиллид *b* используется кислород, указывая на более позднее возникновение последнего [29].

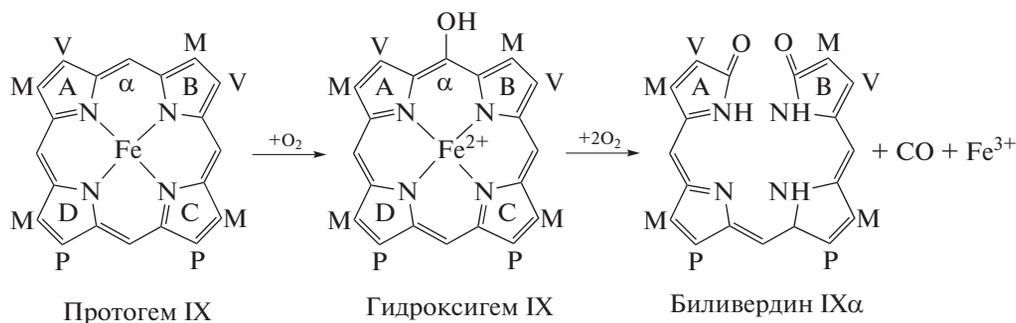
**ПЕРВИЧНЫЙ, ВТОРИЧНЫЙ  
И ТРЕТИЧНЫЙ ЭНДОСИМБИОЗЫ**

*Особенности филогении и систематики  
протист и микроводорослей*

Одноклеточные эукариоты носят общее название протист. Возникает вопрос о числе и последовательности эндосимбиозов, в результате которых среди одноклеточных организмов сформировались микроводоросли [30, 31]. Филогения и систематика протист как находящаяся у корней эукариотного древа жизни активно развиваются. На смену информационным ограничениям сиквенса 16S рРНК приходят сведения о первичной структуре полнотелных геномов, о сиквенсе ДНК индивидуальных клеток и о метагеномных исследованиях, которые позволяют выделить новые таксоны и систематические категории организмов, не укладывающиеся в рамки прежних классификаций (13 типов протист – [32]). В молекулярно-биологической систематике формируются супергруппы, как например сверхтаксон SAR, объединяющий облигатных паразитов, свободных гетеротрофов и фотоавтотрофные виды [33]. Другие еще недавно существовавшие супергруппы, такие, как например, Chromalveolata, подразделяются на отдельные филы [34]. Современная протистология и альгология, где учитываются такие виды, как малярийный плазмодий, утративший хлоропласты и ставший инфекционным возбудителем, оказываются взаимосвязанными науками. Важную роль в классификации водорослевых таксонов играет понимание, что эволюция хлоропластов и эволюция клеток-хозяев обладают значительной самостоятельностью [35]. Возникают новые и по-прежнему используются старые наименования систематических групп и их синонимы. Характерен небольшой (22 вида) отдел глаукофитовых водорослей, в чьем названии используются синонимы: глаукофиты, глауцистокофиты, греко-латинский термин Glaucophyta, или Glaucophyceae, и совместное с красными водорослями название подцарства Biliphyta. Критерии построения эво-



**Рис. 1.** Схема формирования пигментного аппарата оксигенного фотосинтеза у цианобактерий, отражающая объединение в клетке ФС I и ФС II и наличие промежуточной клеточной формы в виде не имеющих антенны протоцианобактерий. Появление фикобилисом (ФБС) у цианобактерий, давших начало архепластидным хлоропластам. Боковые ветви современных цианобактерий, содержащие Хл *b*, Хл *d* или Хл *f* и частично или полностью утратившие фикобилисомы.



**Рис. 2.** Ключевая реакция метаболического пути синтеза фикобилинов, указывающая на наличие в биосфере молекулярного кислорода и гемов как участников цепи переноса электронов ко времени ее эволюционного формирования. Показаны размыкание сформированной ранее кольцевой тетрапиррольной структуры, удаление гемового железа и двухэтапная дезоксигенация с удалением трех молекул O<sub>2</sub> (M – метил, P – пропионил и V – винил; см. текст).

люционных древ, в систематике про- и эукариотов, в классической ботанике, в альгологии и протистологии, в зависимости от классификационных подходов зачастую не совпадают. В международной литературе применяются как латинские, так и английские названия таксонов, которые начинаются как с прописных, так и с заглавных букв (например, гаптофитовые водоросли: Harporhyta, или harporhytes). Наиболее корректным представляется применение международного кода номенклатуры: “International Code of Nomenclature for Algae, Fungi and Plants”, 2018.

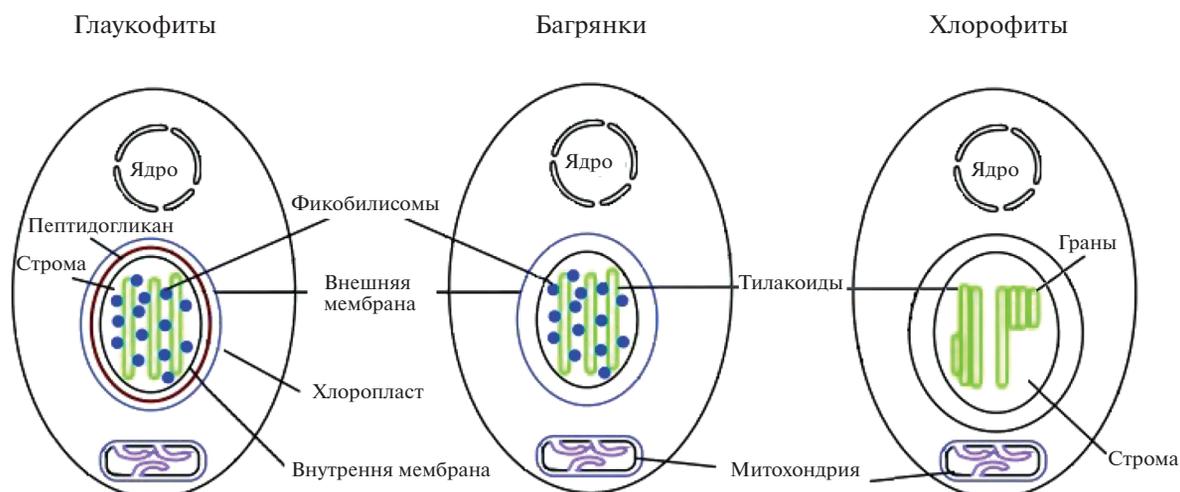
#### Мембранная система хлоропластов у архепластид (*Archaeplastida*)

Бесспорные совпадения в мембранном строении цианобактериальной клетки с хлоропластами зеленых водорослей и высших растений выявлены благодаря электронной микроскопии. Грамотрицательная клетка цианобактерии, обладающая двумя наружными мембранами и межмембранным слоем пептидогликана, превращается в двумембранный хлоропласт (рис. 3). За счет пищеварительной вакуоли хозяина число мембран при фагоцитозе должно стать равным трем, и, следовательно, одна из мембран оказывается утраченной. Редукция мембраны, очевидно, уменьшает число препятствий для трансмембранного транспорта метаболитов. Благодаря различию липидного состава мембран у про- и эукариотов было выяснено, что исчезает мембрана вакуоли [36].

Кроме зеленых водорослей и происшедших от них высших растений, хлоропласты с двойной мембраной найдены у красных и глаукофитовых водорослей, объединенных в группу архепластид (*Archaeplastida*). У глаукофит на стромальной поверхности тилакоидов, как и у цианобактерий, находятся фикобилисомы, хлоропласты сохраняют межмембранный пептидогликан. У красных водорослей фикобилисомы и строение тилакоидов сохраняется, но исчезает пептидогликановый слой

между мембранами. У зеленых водорослей в хлоропластах исчезают фикобилисомы, увеличивается число тилакоидов и уменьшается межтилакоидное пространство. Вместо фикобилисом тилакоиды содержат Хл *a/b*-протеин и разделяются на стопки гран и удлинённые тилакоидные мембраны стромы (рис. 3).

Молекулярно-филогенетические исследования показали, что все три разновидности хлоропластов имеют монофилетическое происхождение: их родоначальником оказался предковый вид из цианобактериальной клады, возникшей 2.1 млрд. лет назад, и родственный ныне живущим примитивным цианобактериям *Gloeomargarita* [36]. Около 1.9 млрд. лет назад благодаря эндосимбиозу, вероятнее всего, со жгутиковым эукариотом возник общий автотрофный предок, который пока не получил своего названия. Этот первый эукариотный ствол архепластидного древа подвергся разновременной дивергенции на три ветви, получившие название синей (глаукофиты), красной (багрянки) и зеленой (зеленые водоросли) линий (рис. 4). Примерно (разброс сроков составляет 200 млн. лет) 1.7 млрд. лет назад возникли глаукофиты, спустя еще 400–100 млн. лет – примитивные одноклеточные багрянки, и, наконец, 1.1 млрд. лет назад – зеленые водоросли [36]. Еще через 600 млн. лет от сеплянковых водорослей, сохранив свойства хлоропластов зеленой линии, возникли высшие растения [37]. Три перечисленные группы водорослей были названы архепластидами. Несмотря на значительный эволюционный возраст все три таксона вместе с цианобактериями сохранились до настоящего времени. Лишь значительно позже, 140–100 млн. лет назад, первичный эндосимбиоз с цианобактерией из рода *Synechococcus*, произошел вновь, дав фотосинтезирующих амёб рода *Paulinella* [38].



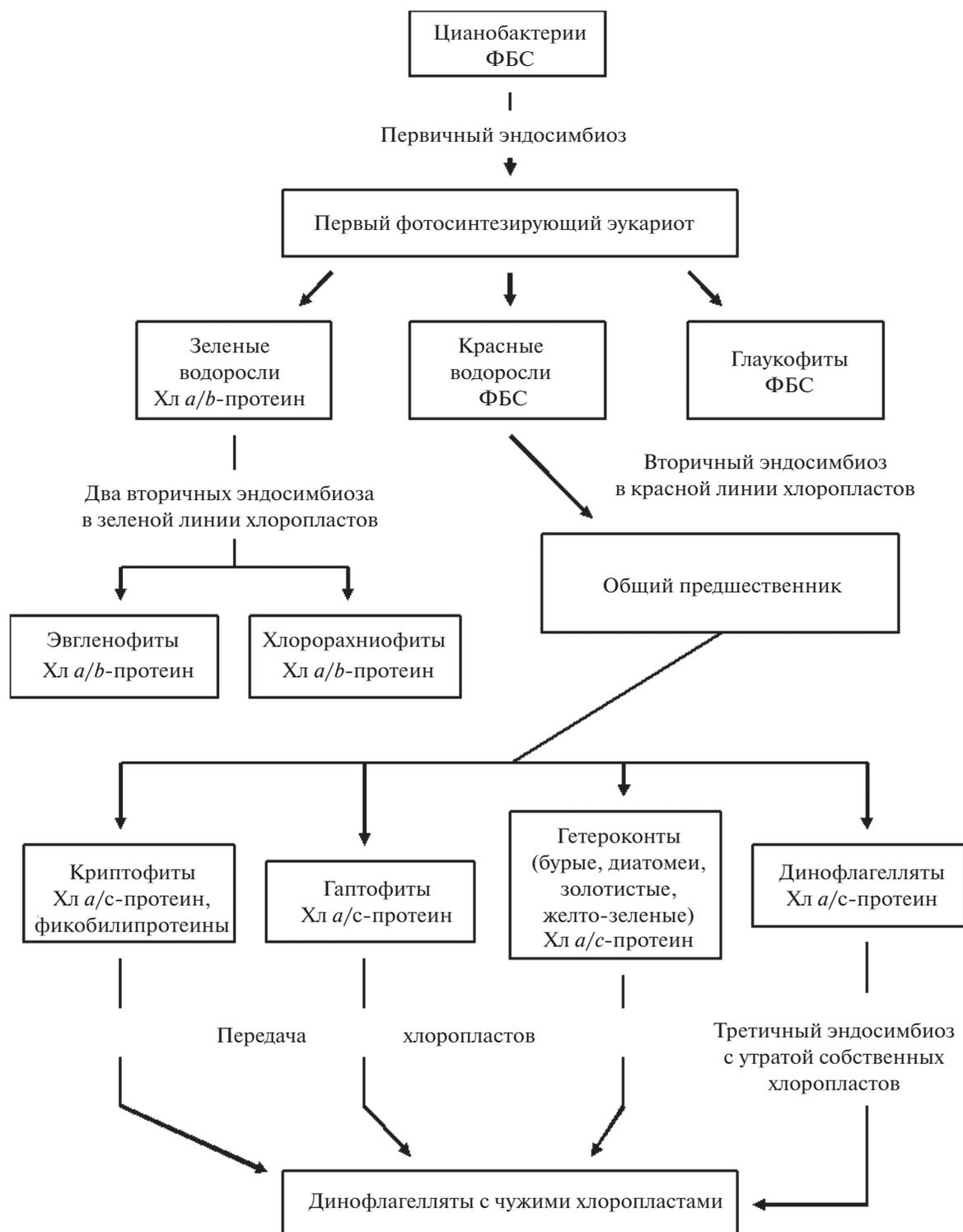
**Рис. 3.** Три типа архепластидных двумембранных хлоропластов. У глаукофитовых водорослей в хлоропластах сохранились фикобилисомы и пептидогликановый слой, находившийся между двумя мембранами цианобактериальной клетки, которые стали двойной мембраной хлоропласта. Багрянки (красные водоросли): сохранили в хлоропластах фикобилисомы, но слой пептидогликана оказался элиминированным. У хлорофитных водорослей в хлоропластах утрачены фикобилисомы, утрачен пептидогликановый слой, среди тилакоидов сформировались граны и уменьшилось межтилакоидное пространство.

### Вторичный эндосимбиоз

Двумембранные хлоропласты архепластидных водорослей получили название первичных. Для их эволюционного происхождения справедливо правило: один цианобактериальный предшественник и три разные группы эукариот, ставших хозяевами хлоропластов. Присутствие хлоропластов с четырьмя мембранами у других микроводорослей объясняется эндосимбиозом с архепластидами и сохранением после фагоцитоза плазмалеммы автотрофного эукариота вместе с фagosомальной мембраной вторичного хозяина [39]. Эукариотная клетка подобна матрешке, у которой внутри находится архепластидный симбионт, а в нем — его хлоропласт. Подобные пластиды названы комплексными, а эндосимбиоз называется вторичным. В эволюции возникла возможность выбора между тремя архепластидными линиями. Глаукофиты, несущие жгутики, не дали эволюционного усложнения хлоропластов. Вторичный эндосимбиоз имел место в двух линиях, идущих от предковых зеленых и красных микроводорослей. В зеленой линии возникли две новые филы: эвгленовые (*Euglenophyta*) и хлороракхиофитовые (*Chlorarachniophyta*) водоросли. В красной линии багрянки послужили хлоропластами разнообразным группам протистов (см. [35, 40] и ссылки). На рис. 4 представлены наиболее известные филы вторичной красной линии, к которым относятся криптофиты, гаптофиты, динофлагелляты и обширная супергруппа гетероконт, объединившая в себе диатомовые, бурые, желто-зеленые, золотистые водоросли и некоторые другие филы.

У части комплексных пластид существуют любопытные особенности, непосредственно вытекающие из феномена эндосимбиоза. Хлоропласты эвгленовых водорослей и динофлагеллят стали трехмембранными благодаря редукции наружной, четвертой мембраны [6], что рассматривается как прогрессивный признак, облегчающий трансмембранный транспорт ассимилятов. У хлороракхиофитовых и криптофитовых водорослей в перипластидном пространстве пластид между второй и третьей мембранами находится нуклеоморф — остаточное ядро с редуцированными хромосомами, оставшимися от промежуточного эукариотного хозяина. В обоих случаях в нуклеоморфе осталось по три палочковидные хромосомы. Так как нуклеоморфы двух групп ведут начало от разных линий, красной и зеленой, они являются интересным примером эволюционного параллелизма. Цитологическое выявление нуклеоморфов и ДНК-сиквенсы принадлежащих им хромосом предоставляют убедительные доказательства вторичного эндосимбиоза [5, 41].

Почему в продолжение эволюции протисты приобретали комплексные хлоропласты вместо новых вариантов первичного симбиоза с цианобактериями? Водоросли с комплексными хлоропластами появились значительно позже архепластид, успевших пройти длительный путь эволюции, за время которого сформировался редуцированный и приспособленный к взаимодействию с эукариотным ядром хлоропласт. Несмотря на усложненную мембранную систему, как ни странно это выглядит внешне, вторичный эндосимбиоз мог осуществляться быстрее и проще, чем



**Рис. 4.** Схема первичного, вторичного и третичного эндосимбиозов хлоропластов в основных таксонах микроводорослей. Обозначены антенные пигмент-белковые комплексы зеленой, синей и красной линии археплатид.

первичный. Большое число возникших водорослевых таксонов (рис. 4) и дивергентное распространение фотосинтеза являются, как известно, признаком биологического прогресса в эволюции.

#### *Третичный и сериальный вторичный эндосимбиозы*

Третичный эндосимбиоз обнаружен только у динофлагеллят, среди которых были найдены виды с комплексными хлоропластами, принадлежащими

иным водорослям красной линии: криптофитовым, гаптофитовым и гетероконтным. Таким образом, были выявлены не совсем понятные гибриды. Можно сравнить с той же матрешкой, в которой утерянная фигурка была заменена на сходную по размеру из других комплектов. Этому феномену находится общепринятое объяснение. При увеличении гетеротрофной составляющей питания в прежних границах обитания или при расширении ареала микроводоросль может перейти к миксотрофному метаболизму, а при устойчивом обилии органики вообще отказаться от автотрофии с редукцией хлоропластов. Облигатная гетеротрофия выгоднее энергетически, но более уязвима. При любом повторном обеднении среды органическим веществом и достаточном времени потребность в фотоавтотрофии может вернуться. Поэтому хлоропласты могут быть ассимилированы вновь благодаря фагоцитарному поглощению других вторичных фотоавтотрофов. Усложненность эволюционного сценария коррелирует с малым числом подобных видов. Число мембран в третичных хлоропластах индивидуально и может равняться двум, трем или четырем в зависимости от вариантов фагоцитирования, например, всасывания хлоропластов с отбрасыванием остальных клеточных компонентов [42]. У динофлагеллят рода *Lepidodinium* описаны случаи третичного эндосимбиоза, когда заново приобретается пластида не вторичного симбионта красной линии, а архепластидный зеленый симбионт с первичными хлоропластами. В этом случае эффект носит название сериального вторичного эндосимбиоза [6, 35].

#### *Апикомплексы и апикопласты*

Апикомплексы – тип простейших, состоящих из облигатных паразитов животных и человека. Входят вместе с динофлагеллятами-фотосинтетиками и инфузориями в монофилетическую надгруппу авльвеолит. Большинство апикомплексных протист, включая токсоплазм и плазмодиев, в том числе возбудителей малярии, содержат редуцированные, утратившие фотосинтез пластиды-апикопласты. Эти маленькие, не более 1.5 мкм органеллы, имеют четыре мембраны. Секвенированный геном апикопласта из *Plasmodium* уменьшен до 35 кб и 68 генов; в протеоме найдено лишь 550 белков (vs 3000 в хлоропластах растений). На примере апикопластов прекрасно видны нефотосинтетические функции пластид. Они участвуют в биосинтезе жирных кислот, изопреноидных кофакторов ряда энзимов, задействованы в путях биосинтеза гемов, железо-серных белковых кластеров и некоторых других соединений. Это облигатная органелла, без которой прерывается клеточный цикл апикомплексов [43, 44]. Интересно, что у микроводоросли *Polytomella*, утратившей фотосинтез, но не ставшей паразитом, пла-

стом полностью утрачен, но в редуцированном хлоропласте происходит накопление некоторого количества крахмала [45].

#### *Замена фикобилисомной антенны с эукариотизацией фотосинтеза*

Насыщение атмосферы кислородом в ходе эволюции не повлияло на селективный отбор хлорофилла *a* в качестве оптимального пигмента фотосинтеза, поскольку  $O_2$  не поглощает свет в видимой области спектра. Присутствие различных антенных пигментов отражается на названиях водорослей, среди которых известны бурые, зеленые, красные (багрянки), золотистые, желто-зеленые, и сине-зеленые (цианобактерии). У обособленной группы цианопрохлорофит к главному пигменту добавляются хлорофилл *b* и у ряда экзотических видов цианобактерий – хлорофиллы *d*, *f* и, возможно, хлорофилл *c* (рис. 1). Зеленые водоросли и высшие растения содержат хлорофилл *b*, обширная группа хромофит – до 10 разновидностей хлорофилла *c* [46–48]. Фикобилисомная антенна цианобактерий сохранилась у глаукофитовых и красных водорослей; “остатки” фикобилисом в виде отдельных фикобилипротеинов имеются у криптофит (рис. 4). Во всех остальных таксонах вплоть до цветковых растений фикобилисомы замещены либо на Хл *a/b*-, либо на Хл *a/c*-содержащие антенные комплексы. Возникает вопрос о причинах замены фикобилипротеиновой антенны. Сравнение спектральных свойств фикобилисом и Хл *a/b*- или Хл *a/c*-протеинов показывает, что фикобилисомы обладают преимуществом светопоглощения как на земной поверхности, так и во всей фотической зоне океана, от глубин до мелководья [6, 49]. Благодаря филогенетической водорослей в морских биотопах, но наземные биогеоценозы образованы растениями только с Хл *a/b*-содержащей антенной [6, 24].

Решающим недостатком фикобилисом как антенны является в 4–9 раз меньшее содержание хромофорных групп на единицу полипептидной массы в сравнении с Хл *a/b*- и Хл *a/c*-протеинами из-за ковалентной связи фикобилиновых тетрапирролов с апопротеинами [25, 50]. Фикобилисомы составляют до 60% водорастворимого белка или до 20% суммарного белка у цианобактерий [50]. На содержание пигментного аппарата клетка, согласно расчетам [51], может тратить не более 1/3 получаемой световой энергии. Подвижность растений в ходе эволюции была утрачена, начиная с макрофитных водорослей, что привело к появлению защитной клеточной стенки. На суше целлюлозная стенка приобрела опорную функцию, разделившись на первичную и вторичную и достигнув сложной архитектоники у покрытосеменных [52, 53]. Ее созданием и функционированием управ-

ляют до 2500 генов, что значительно больше, чем число генов фотосинтетического аппарата [54] и сравнимо с геномом всей цианобактериальной клетки [55].

Причиной утраты фикобилисом является увеличение потребности растительных клеток в усвоении  $\text{CO}_2$ , вызванной появлением клеточной стенки [25]. Из усваиваемого высшими растениями углекислого газа примерно треть приходится на целлюлозу [52, 53], что вступает в противоречие с затратами на поддержание пигментного аппарата. Сохранение фикобилисом у глаукофит соответствует наличию жгутиков и подвижности, что указывает на недоразвитость клеточной оболочки. У макрофитных красных водорослей потребность в укреплении таллома покрывается за счет его кальцификации. Вторым фактором, вызвавшим преобразование антенны, является изменение соотношения ФС I и ФС II в эукариотных хлоропластах. Эукариоты для построения стенки требуют большего усвоения  $\text{CO}_2$ , чем цианобактерии, и хлоропласты экспортируют в цитоплазму больше синтезируемых сахаров. Стандартное отношение ФС I к ФС II у цианобактерий и красных водорослей равняется 3:1 [24]. В ФС I за счет увеличенной доли циклического транспорта электронов может идти активное фотофосфорилирование без фиксации углекислого газа. При взаимодействии двух фотосистем усвоение  $\text{CO}_2$  происходит благодаря линейному электронному транспорту, и соотношение двух фотосистем в хлоропластах растений составляет 1:1, и эта стехиометрия адекватна возрастанию потребности в углекислоте. Увеличенная доля ФС II в хлоропластах находит отражение в появлении тилакоидных гран, причем Хл *a/b*-протеин способствует их формированию и уплотненной компоновке в хлоропласте.

## МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ФУНКЦИЙ ПЛАСТИД

### *Передача пластидных генов в ядро клетки*

В хлоропластах выявлено 3000–4000 белков, из которых не более 3–5% кодируются пластидным геномом [55–57]. Не сохранив 95% цианобактериальных генов, хлоропласты утратили способность к самостоятельному внеклеточному существованию. Даже хлоропласты *Paulinella*, возникшие позже, чем у других архепластид (см. выше) и сохранившие 35–40% генома цианобактерий, не способны к выживанию *in vitro* [58]. Часть пластома была элиминирована как дублирующая геном ядра, некоторая часть перенесена в митохондрии и основная доля благодаря внутриклеточному переносу оказалась в клеточном ядре. Гены, попадавшие в ядро, встраивались в разных пропорциях во все хромосомы [59]. Эти ставшие ядерными

гены кодируют большинство белков пластидной транскрипции, почти все белки процессинга хлоропластной РНК, до двух третей белков пластидных рибосом и большинство регуляторных факторов транскрипции и трансляции. В пластомах сохранились гены фотосинтетических белков, генетической системы и некоторые другие. Сохранение части генетического материала объясняется требованиями быстрого реагирования на смену световых условий фотосинтеза, сложностью обратного внесения в хлоропласт из цитоплазмы ряда гидрофобных мембранных белков и повышенным риском мутирования ДНК под действием АФК в хлоропластах [60, 61].

Хлоропластные геномы микроводорослей несут до 200 генов, у цветковых растений они содержат 100–120 генов. Большая часть сведений о пластомах и протеоме хлоропластов получена на модельных видах, таких как *Chlamydomonas reinhardtii* и *Arabidopsis thaliana*. Кольцевые ДНК хлоропласта существуют в виде 200 и более копий, что объясняется особенностями транскрипции генов у прокариот, и это в несколько раз превышает число копий ДНК у цианобактерий [62]. Так как в клетках мезофилла цветковых растений находятся десятки пластид, то на одну клетку может приходиться  $\geq 10000$  копий пластидной ДНК, что составляет ~20% ее содержания в составе ядра [62].

Контраст между небольшим размером генома и разнообразием протеинов, выявляемых в составе хлоропластов, и их высокой метаболической активностью означает, что большая часть белков присутствует в хлоропласте из цитозоля, что подразумевает существование механизмов регуляции и доставки. Двойная мембрана ядра с ядерными порами и развитая система цитозольных мембран позволяют регулировать поток протеинов, поступающих в хлоропласт. Громоздкие пигмент-белковые комплексы тилакоидных мембран и многие сложные ферменты состоят из полипептидов, кодируемых как пластомам, так и ядерным геномом. Кодируемые в ядре и транспортируемые в хлоропласт белки содержат N-концевой транзитный пептид, который обеспечивает транслокацию сквозь два мультибелковых мембранных канала, называемых ТОС механизмом (translocon at the outer envelope membrane) и ТИС механизмом (translocon at the inner envelope membrane). В комплексных пластидах для обеспечения транспорта белка сквозь четыре пластидные мембраны требуется присоединение к N-концу еще одного короткого пептида, называемого сигнальным. Протеолиз и обновление белков наружной мембраны осуществляется убиквитин-протеосомальной системой, утилизацию белков внутри хлоропласта осуществляют протеазы бактериального происхождения [63, 64].

Пластиды кроме фотосинтеза задействованы, как указано выше, в азотном обмене, синтезе аминокислот, нуклеотидов, изопреноидов, фенольных соединений, жирных кислот, крахмала, участвуют в метаболизме фитогормонов и вторичных метаболитов [55, 65].

Наряду с ферментами и структурными белками существуют сотни ядерно-кодируемых протеинов, которые участвуют в контроле экспрессии пластидного генома. Это регуляторное воздействие ядра на хлоропласт получило название антероградного сигнала. Под ядерным контролем находятся практически все этапы биогенеза и функционирования хлоропластов. Пластом объединил в себе про- и эукариотные признаки: наличие оперонов, интронов и редактирование транскриптов. Основные этапы экспрессии протекают по прокариотическому сценарию, в котором важнейшую роль играет посттранскрипционное созревание РНК: сплайсинг, редактирование и созревание 5'- и 3'- концов РНК.

В зависимости от внешних и внутренних воздействий от хлоропластов в цитозоль, в свою очередь, поступают разнообразные метаболиты, которые, достигая ядра, позволяют клетке оптимизировать фотосинтез. Метаболитный информационный поток от хлоропласта к ядру назван ретроградной сигнализацией. Эти сигналы, направляемые к ядру на стадии биогенеза хлоропластов, называются биогенными, на стадии активного фотосинтеза хлоропластов – операционными, а сигнал от стареющего или поврежденного хлоропласта называется деградиционным сигналом. Сигнальные молекулы биохимически различны и могут быть подразделены на пять групп [66]. 1. Сигналы, связанные с экспрессией хлоропластного генома. 2. Сигналы, идущие от промежуточных продуктов биосинтеза тетрапирролов. 3. Воздействия, вызванные редокс состоянием пластохинона в ЭТЦ хлоропластов и образованием АФК. 4. Поток разнообразных низкомолекулярных соединений, появляющихся в результате метаболических нарушений в хлоропласте. 5. Регуляция, связанная с белками двойной локализации (ядерной и хлоропластной) [67]. Ретроградный сигнал хлоропластов является важной составляющей сети внутриклеточной сигнализации и служит предметом исследований метаболизма и других наук. Многие регуляторные сети и функции сформировались еще на основе цианобактериального генома [68], после чего вместе со структурными и регуляторными генами были переданы в ядерный геном эукариот.

#### *Митохондрии в сравнении с хлоропластами*

Митохондрии, чье формирование в составе эукариотной клетки произошло раньше, чем эндосимбиоз хлоропластов [16–18], имеют с ними многие черты сходства, начиная с двойной на-

ружной мембраны [5, 6]. Протеомы в обоих случаях насчитывают до 2000–3000 белков, размеры геномов, состоящих из 150–200 генов, также сравнимы. Величина митохондриального протеома находится в сильной зависимости от водородного потенциала, а у наземных растений еще и от вида ткани и различиях филогенетических и онтогенетических условий. При этом у растительной клетки митохондриом (300–800 т.п.н.) выглядит значительно большим, чем у грибов и животных, где он равен 16–100 т.п.н. Большинство генов протомитохондрий оказались перенесенными в ядерный геном, как впоследствии произошло и в ходе эволюции хлоропластов. К примеру, белковые комплексы электрон-транспортных цепей в обоих типах энергодающих компартментов клетки состоят из полипептидов, кодируемых в ядерном геноме и в геноме органелл. Ретроградный и антероградный сигналинг с ядром также сближает две энергодающие органеллы. Сопоставление пластома и ядерного генома демонстрирует лишь односторонний перенос генов в ядро. В отличие от хлоропластов, перенос генов между ядром и митохондриями является двусторонним процессом, и это различие еще не нашло убедительного объяснения [69]. Существует также однонаправленный цитозольный перенос генов от хлоропластов к митохондриям, который, вероятно, реализуется напрямую, минуя посредничество ядра. Таким образом, растительная клетка представляет собой генетическую систему, состоящую из трех взаимодействующих геномов. В случае таких водорослей, как криптозооиды, к ним присоединяется четвертый геном, находящийся в нуклеоморфе.

#### СИМБИОЗЫ С УЧАСТИЕМ ЦИАНОБАКТЕРИЙ И МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

В синэкологии описаны многочисленные разновидности факультативных и облигатных симбиозов с участием цианобактерий и микроводорослей, которые сопровождаются ингибированием протеаз и других ферментов переваривания “пищи”, но не завершаются образованием хлоропластов. Симбиозы микроорганизмов с многоклеточными растениями и животными являются одним из разделов общей теории симбиотических взаимоотношений, предметом исследований хологеномики [70].

#### *Синцианозы*

Симбиозы с участием цианобактерий, фото- и diaзотрофов получили название синцианозов. Эпифитные цианобактерии используют другие организмы в качестве субстратов, в том числе водорослей, а также образуя бактериальные маты совместно с гетеротрофными микробами. В эпизинцианозах нельзя исключать метаболитный обмен

цианобактерий с опорными организмами [71]. Диазотрофные цианобактерии-микросимбионты селятся внутри клеток морских диатомей, играющих роль макросимбионтов. Внутри клеток диатомей, став эндосимбионтами, цианобактерии могут утрачивать фотосинтетическую функцию [72]. В синцианозы с наземными растениями чаще всего вступают гетероцистные нитчатые цианобактерии-азотфиксаторы рода *Nostoc*. Партнерами могут быть антоцеротовые, печеночные и листовые мхи, в том числе сфагнум, среди цветковых – травянистое растение *Gunnera*. Цианобактерии находятся в спецполостях кораллоподобных корней у голосеменных саговниковых пальм и в листьях водного папоротника азолла, где служат внеклеточными эндосимбионтами [73]. В симбиозах с протистами, беспозвоночными и низшими хордовыми цианобактерии выполняют роль фотоавтотрофов. *Synechococcus* sp. и *Prochloron* являются внутриклеточными цианобактериями-симбионтами циалиат и радиолярий. Кроме протист, *Synechococcus* и *Prochloron* обитают в симбиозе с асцидиями семейства Didemnidae (дидемниевые) [73, 74]. Среди губок описано более 100 видов, вступающих в симбиоз как с одноклеточными, так и с нитчатыми цианобактериями.

#### Лишайники

Благодаря изучению лишайников сформировалось само понятие симбиоза (А. де Бари). В лишайнологии описано 26.000–27.000 видов этих организмов, которые являются симбионтами гриба и водоросли или цианобактерии. Зеленые водоросли входят в состав 80–85% видов, в остальных находятся цианобактерии. Гриб носит название микобионта, водоросль или цианобактерия – фико- или фотобионта. В талломах лишайника реализуются не прямой или приповерхностный контакт между симбионтами, или же гаустории гриба проникают в клетку водоросли. В двухкомпонентных лишайниках присутствует один вид фотобионта, но известны трехкомпонентные виды, формируемые грибом, зеленой водорослью и цианобактерией в качестве азотфиксатора. На поверхности таллома может находиться второй вид гриба из класса базидиомицетов [75]. Поэтому лишайники являются сложносоставными организмами, которые правильнее было бы называть симбиотической ассоциацией. Обнаружены актинолишайники, в которых прокариотный и эукариотный участники меняются ролями. Функции гриба выполняют прокариоты, за черты сходства с грибами названные актиномицетами, а роль фотобионта – зеленая водоросль, как в истинных лишайниках. Между фико- и микобионтом происходит обмен метаболитами, но отсутствует эндосимбионтное формирование пластид. Просматривается, однако, некая аналогия: ци-

анобактерию-фитобионт можно сравнить с первичным эндосимбионтом, симбиоз с зеленой водорослью формально сравним со вторичным эндосимбиозом [76].

#### Приобретаемая автотрофия и клептопластия

Приобретенной автотрофией называется способность водных гетеротрофов заглатывать микроводоросли, длительно поддерживая их жизнеспособность. Там, где в экологических нишах есть недостаток хотя бы одного из органических метаболитов, появляются стимулы для сожительства с автотрофами. Их приобретение повышает выживаемость за счет циркуляции продуктов фотосинтеза в метаболических сетях клеток и тканей. Хозяин получает от временного “раба” дополнительный доступ к кислороду и низкомолекулярные, в том числе азотные, фотосинтаты, в ответ предоставляя CO<sub>2</sub> от своей дыхательной деятельности. Происходит даже стимуляция фотосинтетической активности симбионтов, которыми служат диатомовые, хлорофитные и красные водоросли, динофлагелляты и гаптофиты [77]. Наряду с фотосинтетической деятельностью, водоросли сохраняются в вакуолях клеток хозяев как консервируемая пища. Благодаря огромной разнице в размерах микро- и макросимбионтов число заглотанных микроводорослей может достигать до 7.000–20.000 на клетку, хотя в среднем оно значительно меньше. Среди одноклеточных хозяев феномен приобретенной автотрофии охватывает прежде всего инфузорий (*Rhizaria*) и донных фораманифер (*Foraminifera*). Возможность замедлять переваривание жертвы за счет подавления протеаз, вероятно, дублирует начальные стадии феномена эндосимбиоза. Наиболее частый пример – симбиоз между ресничной инфузурией *Paramecium bursaria* и *Chlorella* sp. Если от проглоченной автотрофной клетки остаются только хлоропласты, они носят название клептопластов, а эффект их присвоения в целом называется клептопластией. Разные протисты могут сохранять приобретенные хлоропласты от 1–3 суток до 2 недель. Инфузория *Myrionecta* накапливает клептопласты, питаясь клетками криптомонад, и, в свою очередь, становится жертвой динофлагелляты *Dinophysis*, которая затем сохраняет их еще до двух месяцев. Тем самым, между приобретенной автотрофией, клептопластией и третичным эндосимбиозом границы размываются, но приобретенная автотрофия и клептопластия не сопровождаются массовым переносом генов от хлоропластов к ядру [78].

Многоклеточные хозяева микроводорослей встречаются среди различных видов *Porifera* (губки), *Cnidaria* (кораллы, анемоны, гидры), *Mollusca* (тридакны и голожаберники), *Acoelomorpha* (плоские черви) и даже у эмбрионов *Chordata* (асцидии). Наиболее известен ползающий моллюск *Elysia*

*chlorotica*, эксплуатирующий клептопластиды поедаемых водорослей до 9 месяцев в своих покровных тканях [79].

#### Метаболическое разнообразие динофлагеллят

Динофлагелляты, или панцирные жгутиконосцы, отличаются фантастическими трофическими возможностями, заслуживая отдельного рассмотрения. К ним относится около 2500 современных видов (иные названия: динофиты, перидиней, или *Dinoflagellata*, *Dinophyta*, *Peridinea*), входящих в надтип альвеолят (*Alveolata*). В этом таксоне протистов возможны все варианты перехода от хемогетеротрофии к истинному эндосимбиозу. 1) Около половины всех видов являются фотоавтотрофами, среди которых описаны симбионты двусторчатых моллюсков и кораллов, где они носят название зооксантелл. 2) Имеются утратившие пластиды бесцветные виды-гетеротрофы, в том числе паразитические формы. 3) Найдено несколько вторичногетеротрофных видов, утративших хлоропласты и приобретших их вновь от микроводорослей других групп (третичный эндосимбиоз, см. выше). 4) У многих видов хищных динофлагеллят практикуется клептопластия, временное сохранение пластид от поедаемых ими микроводорослей. Миксотрофия, то есть сочетание фототрофного и гетеротрофного метаболизма, является нередкой не только среди динофлагеллят, но и других представителей морского фитопланктона [78].

### ЭВОЛЮЦИЯ ПЛАСТИД У ЦВЕТКОВЫХ РАСТЕНИЙ

Цветковые, или покрытосеменные, являются самой высокоорганизованной ботанической филой с телом растения, разделенным на вегетативные и генеративные органы, где пластиды претерпели ряд частных и общих изменений [37]. Современные базы генетических данных позволяют разделить исследовать ядерную и пластомную филогению как крупных, так и мелких таксонов.

#### Два типа хлоропластов для $C_3$ и $C_4$ фотосинтеза

Фотосинтетики с выходом на сушу оказались в условиях возросшей инсоляции и нехватки воды. Для фотосинтетического усвоения  $CO_2$  в строме хлоропласта служит цикл Кальвина, сформированный еще у цианобактерий. Большинство цветковых растений используется  $C_3$ -путь фиксации углерода, когда углекислый газ улавливается напрямую из воздуха, а растение из-за транспирации вынуждено терять до 97% воды, поступающей от корней. Закрытие устьиц уменьшает испарение, но стимулирует фотодыхание, ведя к потерям углерода и снижению эффективности фотосинтеза. У  $C_4$  растений в клетках мезофилла вместо  $CO_2$  фиксируется гидрокарбонат-ион,  $HCO_3^-$ , и пер-

вым продуктом фотосинтеза служит вместо 3-фосфоглицерата  $C_4$ -шавелевоуксусная кислота. В этом ферментном пути уменьшена потребность в  $H_2O$ , устьица на свету остаются открытыми и фотодыхание отсутствует. Проводящие пучки, доставляющие воду, окружены в листе двумя слоями морфологически различных зеленых клеток паренхимы, что названо Kranz-анатомией (немецкое *Kranz* – корона, венец). Внешний слой образуют клетки мезофилла, а внутренний – меньшие по численности клетки обкладки сосудистого пучка. Перевод  $CO_2$  в растворимую форму происходит в наружных хлорофилл-содержащих клетках, а повторная фиксация  $CO_2$  в цикле Кальвина – во внутреннем слое обкладки. В результате диморфизма во внешнем слое клеток находятся “обычные” хлоропласты с тилакоидами, разделенными на грани и строму, а хлоропласты обкладки имеют меньшее число гран и меньшее содержание ФС II.

Эволюционный возраст  $C_4$ -фотосинтеза составляет не более 30.000 лет, но в аридных зонах этот путь метаболизма неоднократно возникал в различных семействах цветковых, являясь ярким примером конвергентной эволюции [80].  $C_4$ -путь требует несколько большего расхода энергии, но подобные растения, в основном травы, обеспечивают до 30% наземного фотосинтеза. Известен также САМ-фотосинтез (метаболизм по типу толстянковых), который включает в себя некоторые ферменты  $C_4$ -пути, но усвоение  $CO_2$  разделено не между клетками, а во времени. У САМ-растений в концентрирующем  $CO_2$  механизме используются ферменты фотодыхания [81].

#### Вегетативная гибридизация и видообразование

В дикой природе и в селекционном процессе межвидовая и межродовая гибридизация могут происходить за счет совместной передачи хлоропластов и цитоплазмы от одного вида к близкородственному, сочетаясь в гибридной клетке с его ядрами. (По всей видимости, эмпирически использовано в селекционной работе И.В. Мичуриным). В частности, для рода *Heuchera* показано, что природное видообразование благодаря появлению новых пластидно-ядерных комбинаций происходило неоднократно [82, 83].

#### Пластиды генеративных и вегетативных тканей и органов

У цветковых растений в мезофилле листьев хлоропласты имеют размеры 3–10 мкм. Пластиды других органов и тканей, выполняющие иные функции, характеризуются разнообразием формы, размеров и окраски. В ботанической литературе подробно описаны их разновидности: 1) родоначальные органеллы-пропластиды в меристемах, семенах и

яйцеклетках; 2) содержащие протохлорофиллиды этиопласты выросших в темноте проростков; 3) окрашенные накопленными каротиноидами хромопласты цветков и плодов; 4) бесцветные лейкопласты запасяющих органов, в зависимости от типа накапливаемых веществ называемые олеопластами, протеинопластами и амилопластами; 5) гравипласты тканей кончика корня и боковых ветвей; 6) геронтопласты с продуктами фотодеструкции хлорофилла в листопадных листьях; 7) таннопласты с накоплениями танина [84].

ДНК всех типов пластид остается идентичной, то есть при формировании тех или иных органов растения увеличения или уменьшения размеров генома в пластидах не происходит. Дифференцированно меняется активность большинства генов, находящихся под контролем клеточного ядра. Многие пласты способны к взаимопревращениям, что сопровождается изменениями мембран, состава пигментов, формы и размеров органелл. Этиопласты являются наиболее изученной разновидностью пластид благодаря прекрасной доступности для экспериментальных исследований. Были исследованы биосинтез протохлорофиллида, действие фотофермента протохлорофиллидоксиоредуктазы, накопление проламеллярных тел и их световое превращение в тилакоиды, развитие фотосинтетической активности и световая и гормональная регуляция зеленения [85, 86]. Сведения о других пластидах отстают от изучения этиопластов из-за нехватки молекулярно-генетических данных [87]. Изменения хлоропластов в зависимости от дифференциации тканей обнаруживаются, начиная с меристемных клеток макрофитных водорослей. Молекулярные механизмы развития хлоропластов, взаимопревращений разных типов пластид, как и природа сигналов от хлоропласта в ядро, еще остаются во многом открытыми вопросами.

#### *Паразитические, насекомоядные и миксотрофные виды*

До 1% всех цветковых растений составляют виды-паразиты и полупаразиты, утратившие или частично сохранившие хлорофилл и питающиеся с помощью гаусторий от других растений. Например, сем. *Orobanchaceae* (заразиховые) – облигатные паразиты с редуцированными листьями и корнями. Знаменитая раффлезия с самым большим цветком в мире относится к полным паразитам. В хвойных лесах северного полушария встречается бесхлорофилльный подбельник (*Monotropa*, сем. вересковые), живущий за счет тесного симбиоза с грибами. В хищничество (насекомоядные растения) вовлечено меньшее число видов, чем в паразитизм. Все они в меньшей степени, чем автотрофы, зависят от фотосинтеза. Пластыды всех подобных растений подвержены уменьшению

размеров генома (до 70 т.п.н.) с утратой фотосинтетического аппарата [88].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследователи всегда находили яркие образы для описания симбиогенеза хлоропластов, которых называли “маленькими зелеными рабами клетки” (К.С. Мережковский), “проглоченными и не переваренными” (P.J. Keeling) и “продуктом шопинга для эукариотов” (A.W.D. Larkum). К настоящему времени сложилось понимание, что роль симбиогенеза в происхождении и развитии клеточной жизни выходит за рамки появления отдельных органелл. Симбиотические отношения, начиная с синтрофии ранних микроорганизмов, пронизывают все процессы взаимодействий в экосистемах. Возникла симбиогенетика как новая биологическая дисциплина; симбиогенез, параллельный перенос генов и сигнальные внутриклеточные и межклеточные взаимодействия лежат в основе развития жизни.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-14-50366.

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. *Mereschkowsky C.* Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche // *Biol. Centralbl.* 1905. V. 25. S. 593.
2. *Мережковский К.С.* Теория двух плазм, как основа симбиогенеза, нового учения о происхождении организмов // Казань: Типо-лит. Имп. ун-та., 1909. 94 с.
3. *Хахина Л.Н.* Проблема симбиогенеза. Л.: Наука, 1979. 156 с.
4. *Колчинский Э.И.* Единство эволюционной теории в разделенном мире XX века. СПб.: Нестор-История, 2015. 822 с.
5. *Gibbs S.P.* The evolution of algal chloroplasts // *Origins of plastids: Symbiogenesis, prochlorophytes and the origins of chloroplasts* / Ed. by R.A. Lewin. Springer-Science+Business Media, 1993. P. 107.
6. *Archibald J.M.* Endosymbiosis and eukaryotic cell evolution // *Curr. Biol.* 2015. V. 25. P. 911.
7. *Martin W., Kowallik K.W.* Annotated english translation of Mereschkowsky's 1905 paper “Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche” // *Eur. J. Phycol.* 1999. V. 34. P. 287.
8. *Стрельникова Н.И.* Мережковский К.С. и его работы по диатомовым водорослям (к 150-летию со дня рождения) <http://www.ksu.ru/conf/botan200/s183.rtf>

9. Захаров И.А. 100 лет теории симбиогенеза // Вестник ВОГиС. 2009. Т. 13. С. 355.
10. Проворов Н.А. К.С. Мережковский и происхождение эукариотической клетки: 111 лет теории симбиогенеза // Сельскохозяйственная биология. 2016. Т. 51. С. 746.
11. Федонкин М.А. Сужение геохимического базиса жизни и эвкарриотизация биосферы: причинная связь // Палеонтологический журнал. 2003. № 6. С. 33.
12. Розанов А.Ю. Бактериальная палеонтология, седиментогенез и ранние стадии эволюции биосферы // Труды ГИН РАН. М. 2004. Вып. 565. С. 448.
13. Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 4576.
14. MacLeod F., Gareth S. Kindler G.S., Wong H.L., Chen R., Burns B.P. *Asgard archaea*: diversity, function, and evolutionary implications in a range of microbiomes // AIMS Microbiology. 2019. V. 5. P. 48. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2019.1.48>
15. Yutin N., Wolf M.Y., Wolf Y.I., Koonin E.V. The origins of phagocytosis and eukaryogenesis // Biology Direct. 2009. V. 4. P. 9. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-4-9>
16. Шестаков С.В. Роль архей в происхождении эукариот // Экологическая генетика. 2017. Т. 15. С. 52. <https://doi.org/10.17816/ecogen15452-59>
17. Martijn J., Vosseberg J., Guy L., Offre P., Ettema T.J.G. Deep mitochondrial origin outside the sampled alphaproteobacteria // Nature. 2018. V. 557. P. 101.
18. Lypcz-Garcia P., Móreira D. The syntrophy hypothesis for the origin of eukaryotes revisited // Nature Microbiol. 2020. V. 5. P. 655.
19. Горленко В.М. Аноксигенные фототрофные бактерии // Труды института микробиологии им. С.Н. Виноградского. М. 2010. Вып. XV. С. 133.
20. Wachterschauser G. From volcanic origins of chemoautotrophic life to Bacteria, Archaea and Eukarya // Philosophical Transactions Roy. Soc. B: Biol. Sci. 2006. V. 361. P. 1787.
21. Schopf J.W., Kudryavtsev A.B., Agresti D.G., Wdowiak T., Czaja F.D. Laser-Raman imagery of Earth's earliest fossils // Nature. 2003. V. 416. P. 73.
22. Schirrmeyer B.E., Gugger M., Donoghue P.C.J. Cyanobacteria and the great oxidation event: evidence from genes and fossils // Palaeontology. 2015. V. 58. P. 769.
23. Nelson N., Junge W. Structure and energy transfer in photosystems of oxygenic photosynthesis // Annu. Rev. Biochem. 2015. V. 84. P. 659.
24. Стадничук И.Н., Красильников П.М., Зленко Д.В. Фикобилисомы и фикобилипротеины цианобактерий // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 131.
25. Стадничук И.Н., Тропин И.В. Замена антенны в эволюционной истории хлоропластов // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 385.
26. Keely B.G. Geochemistry of chlorophylls // Chlorophylls and Bacteriochlorophylls / Eds. Grimm B., Porra R.J., Rüdiger W., Scheer H. Springer, Dordrecht, 2006. P. 535.
27. Granick S. Speculations on the origins and evolution of photosynthesis // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1957. V. 69. P. 292.
28. Beale S.I. Enzymes of Chlorophyll Biosynthesis // Photosynth. Res. 1999. V. 60. P. 43.
29. Oster U., Tanaka R., Tanaka A., Rüdiger W. Cloning and functional expression of the gene encoding the key enzyme for chlorophyll *b* biosynthesis (CAO) from *Arabidopsis thaliana* // Plant J. 2000. V. 21. P. 305.
30. Саун П., Уиттик А. Основы альгологии. Москва: Мир, 1990. 595 с.
31. Кусакин О.Г., Дроздов А.Л. Филема органического мира. Ч. 2. Prokaryota, Eukaryota. СПб.: Наука, 1987. 381 с.
32. Хаусман К., Хюльсман Н., Радек К. Протистология. Москва: Товарищество научн. изданий КМК, 2010. 495 с.
33. Cavalier-Smith T. Kingdom Chromista and its eight phyla: a new synthesis emphasising periplastid protein targeting, cytoskeletal and periplastid evolution, and ancient divergences // Protoplasma. 2017. V. 255. P. 297. <https://doi.org/10.1007/s00709-017-1147-3>
34. Burki F., Okamoto N., Pombert J.F. Keeling P.J. The evolutionary history of haptophytes and cryptophytes: phylogenomic evidence for separate origins // Proc. Biol. Sci. 2012. V. 279. P. 2246. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.2301>
35. Keeling P.J. The endosymbiotic origin diversification and fate of plastids // Philos. Trans. R. Soc. 2010. V. 365. P. 792.
36. Sánchez-Baracaldo P., Raven J.A., Pisani D., Knoll A.H. Early photosynthetic eukaryotes inhabited low-salinity habitats // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. V. 114: e7737.
37. Donoghue P., Paps J. Plant evolution: assembling land plants // Current Biology. 2020. V. 30. P. R81. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.11.084>
38. Lhee D., Ha J.-S. Kim S., Park M.G., Bhattacharya D., Yoon H.S. Evolutionary dynamics of the chromatophore genome in three photosynthetic *Paulinella* species // Sci. Reports. 2019. V. 9. 1 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38621-8>
39. Gibbs S.P. The chloroplast of some algal groups may have evolved from endosymbiotic eukaryotic algae // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1981. V. 361. P. 193.
40. Archibald J.M. The puzzle of plastid evolution // Current Biol. 2009. V. 19. P. R81.
41. Ludwig M., Gibbs S.P. Evidence that the nucleomorphs of *Chlororachnion reptans* (Chlororachniophyceae) are vestigial nuclei: morphology, division and DNA-DAPI fluorescence // J. Phycol. 1989. V. 25. P. 385.
42. Luo Z., Hu Z., Tang Y., Mertens K.N., Leaw C.P., Lim P.T., Teng S.T., Wang L., Gu H. Morphology, ultrastructure, and molecular phylogeny of *Wangodinium sinense* Gen. Et Sp. Nov. (Gymnodiniales, Dinophyceae) and revisiting of *Gymnodinium dorsalisulcum* and *Gymnodinium impudicum* // J. Phycol. 2018. V. 54. P. 744. <https://doi.org/10.1111/jpy.12780>
43. Sheiner L., Vaidya A.B., McFadden G.I. The metabolic roles of the endosymbiotic organelles of *Toxoplasma*

- and *Plasmodium* spp. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2013. V. 16. P. 452.
44. *Striepen B.* The apicoplast: a red alga in human parasites // *Essays Biochem.* 2011. V. 51. P. 111. <https://doi.org/10.1042/BSE0510111>
  45. *Smith D. R., Lee R. W.* A Plastid without a genome: evidence from the nonphotosynthetic green algal genus *Polytomella* // *Plant Physiol.* 2014. V. 164. P. 1812.
  46. *Larkum A.W.D.* Light-harvesting systems in algae // *Photosynthesis of Algae* / Eds. A.W.D. Larkum, S.E. Douglas, J.A. Raven. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 2003. P. 277.
  47. *Tomo T., Allakhverdiev S.I.* The divergence of chlorophyll and photosynthetic reactions in chlorophyll *d*-containing algae // *Современные проблемы фотосинтеза* / Под ред. С.И. Аллахвердиева, А.Б. Рубина, В.А. Шувалова. Москва-Ижевск, 2014. Т. II. С. 115.
  48. *Averina S.G., Velichko N.V., Pinevich A.A., Senatskaya E.V., Pinevich A.V.* Non-*a* chlorophylls in cyanobacteria // *Photosynthetica.* 2019. V. 57. P. 1109.
  49. *Raven J.A.* Photosynthesis in watercolours // *Nature.* 2007. V. 448. P. 418.
  50. *Glazer A.N.* Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 1.
  51. *Raven J.A.* A cost-benefit analysis of photon absorption by photosynthetic unicells // *New Phytol.* 1984. V. 98. P. 274.
  52. *Горшкова Т.А.* Растительная клеточная стенка как динамичная система. Москва: Наука, 2007. 428 с.
  53. *Sarkar P., Bosneaga E., Auer M.* Plant cell walls throughout evolution: towards a molecular understanding of their design principles // *J. Exp. Bot.* 2009. V. 60. P. 3615.
  54. *Yong W., O'Malley R., Link B.* Plant cell wall genomics // *Planta.* 2005. V. 221. P. 745.
  55. *Кузнецов В.В.* Структура и экспрессия хлоропластного генома // *Физиология растений.* 2018. Т. 65. С. 243.
  56. *Martin W., Rujan T., Richly E., Hansen A., Cornelsen S., Lins T., Leister D., Stoebe B., Hasegawa M., Penny D.* Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 12246.
  57. *Nakayama T., Archibald J.M.* Evolving a photosynthetic organelle // *BMC Biol.* 2012. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-35>
  58. *Ponce-Toledo R.I., López-García P., Moreira D.* Horizontal and endosymbiotic gene transfer in early plastid evolution // *New Phytologist.* 2019. V. 224. P. 618. <https://doi.org/10.1111/nph.15965>
  59. *Matsuo M., Ito Y., Yamauchi R., Obokata J.* The rice nuclear genome continuously integrates, shuffles, and eliminates the chloroplast genome to cause chloroplast–nuclear DNA flux // *The Plant Cell.* 2005. V. 17. P. 665.
  60. *Allen J.F.* The CoRR hypothesis for genes in organelles // *J. Theor. Biol.* 2017. V. 434. P. 50. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.04.008>
  61. *Tripathi D., Oldenburg D.J., Nam A., Bendich A.J.* Reactive oxygen species, antioxidant agents, and DNA damage in developing maize mitochondria and plastids // *Frontiers in Plant Science.* 2020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00596>
  62. *Bendich A.J.* Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome? // *Bioessays.* 1987. V. 6. P. 279. <https://doi.org/10.1002/bies.950060608>
  63. *Даниленко Н.Г., Давыденко О.Г.* Миры геномов органелл. Минск: Тэхналогія, 2003. 494 с.
  64. *Ling Q., Jarvis P.* Regulation of chloroplast protein import by the ubiquitin E3 ligase SP1 is important for stress tolerance in plants // *Current Biology.* 2015. V. 25. P. 1.
  65. *Юрина Н.П., Одицова М.С.* Ретроградная сигнальная система хлоропластов // *Физиология растений.* 2019. Т. 66. С. 243.
  66. *Pfannschmidt T., Terry M.J., Van Aken O., Quiros P.M.* Retrograde signals from endosymbiotic organelles: a common control principle in eukaryotic cells // *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2020. V. 375. 20190396. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0396>
  67. *Krupinska K., Blanco N.E., Oetke S., Zottini M.* Genome communication in plants mediated by organelle–nucleus-located proteins // *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2020. V. 375: e 20190397. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0397>
  68. *Синетова М.А., Лось Д.А.* Уроки транскриптомики цианобактерий: универсальные гены // *Мол. биология.* 2016. Т. 50. С. 685.
  69. *Константинов Ю.М., Дмитриш А., Вебер-Лотфи Ф., Ибрагим Н., Клименко Е.С., Тарасенко В.И., Болотова Т.А., Кулинченко М.В.* Импорт ДНК в митохондрии // *Биохимия.* 2016. Т. 81. С. 1307.
  70. *Zilberg-Rosenberg J., Rosenberg E.* Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution // *FEMS Microbiol. Rev.* 2008. V. 32. P. 723.
  71. *Murakami A., Miyashita H., Iseki M., Adachi K., Mimuro M.* Chlorophyll *d* in an epiphytic cyanobacterium of red algae // *Science.* 2004. V. 303. P. 1633.
  72. *Nakayama T., Kamikawa R., Tanifuji G., Kashiyama Y., Ohkouchi N., Archibald J.M., Inagaki Y.* Complete genome of a nonphotosynthetic cyanobacterium in a diatom reveals recent adaptations to an intracellular lifestyle // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2014. V. 111. P. 11407.
  73. *Adams D.G., Bergman B., Nierzwicki-Bauer S.A., Duggan P.S., Rai A.N., Schüßler A.* Cyanobacterial–Plant Symbioses // *The Prokaryotes* / Eds. Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. Springer, 2002. P. 359.
  74. *Пиневиц А.В., Аверина С.Г., Величко Н.В.* Очерки биологии прохлорофитов. С.-Петербург: Изд-во СПб ун-та, 2010. 197 с.
  75. *Tuovinen V., Ekman S., Thor G., Vanderpool D., Spribille T., Johannesson H.* Two basidiomycete fungi in the cortex of wolf lichens // *Current Biol.* 2019. V. 29. P. 476.
  76. *Spribille T.* Lichen symbionts outside of symbiosis: how do they find their match? A commentary on: 'A case study on the re-establishment of the cyanolichen sym-

- biosis: where do the compatible photobionts come from?' // *Annals Botany*. 2019. V. 124. P. 379.
77. *Johnson M.D.* The acquisition of phototrophy: adaptive strategies of hosting endosymbionts and organelles // *Photosynth. Res.* 2011. V. 107. P. 117. <https://doi.org/10.1007/s11120-010-9546-8>
78. *Stoecker D.K., Hansen P.J., Caron D.A., Mitra A.* Mixotrophy in the Marine Plankton // *Ann. Rev. Mar. Sci.* 2017. V. 9. P. 311.
79. *Клочкова Т.А.* Обзор явления клептопластии у морских заднежаберных моллюсков // *Вестник КамчатГТУ*. 2016. № 37. С. 57. <https://doi.org/10.17217/2079-0333-2016-37-57-69>
80. *Sage R.F., Stata M.* Photosynthetic diversity meets biodiversity: The C<sub>4</sub> plant example // *Plant Physiol.* 2015. V. 172. P. 104.
81. *Иванищев В.В.* Эволюционные аспекты C<sub>4</sub>-фотосинтеза // *Известия ТулГУ. Естественные науки*. 2017. Вып. 3. С. 64.
82. *Folk R.A., Soltis P.S., Soltis D.E., Guralnick R.* New prospects in the detection and comparative analysis of hybridization in the tree of life // *Am. J. Bot.* 2018. V. 105. P. 364.
83. *Kiu L.-X., Du Y.-X., Folk R.A., Wang S.-Y., Soltis D.E., Shang F.-D., Li P.* Plastome evolution in Saxifragaceae and multiple plastid capture events involving *Heuchera* and *Tiarella* // *Front. Plant Sci.* 2020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.0036183>
84. *Brillouet J.M., Romieu C., Schoefs B., Solymosi K., Cheynier V., Fulcrand H., Verdeil J.L., Conéjéro G.* The tannosome is an organelle forming condensed tannins in the chlorophyllous organs of Tracheophyta // *Annals Botany*. 2013. V. 112. P. 1003.
85. *Беляева О.Б., Синещев В.А.* Регуляция биосинтеза хлорофилла *a* фитохромом // *Биохимия*. 2019. Т. 84. С. 648.
86. *Кузнецов В.В., Дорошенко А.С., Кудрякова Н.В., Данилова М.Н.* Роль фитогормонов и света в процессе дезиоляции // *Физиология растений*. 2020. Т. 67. С. 563.
87. *Jarvis P., López-Juez E.* Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014. V. 27. P. 787.
88. *Westwood J.H., Yoder J.I., Timko M.P., de Pamphilis C.W.* Evolution of parasitism in plants // *Trends Plant Sci.* 2010. V. 15. P. 227.
89. *Филюшин М.А., Кочиева Е.З., Щенникова А.В., Белецкий А.В., Марданов А.В., Равин Н.В., Скрябин Н.Г.* Профиль экспрессии генов унипортеров семейства SWEET в процессе развития ловчих аппаратов плотоядного растения *Nepenthes* sp. // *Генетика*. 2019. Т. 55. С. 655.

УДК 581.1

## РАСТИТЕЛЬНЫЕ ЭКСПРЕССИОННЫЕ СИСТЕМЫ – НОВЫЙ ЭТАП В ПРОИЗВОДСТВЕ БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

© 2021 г. А. А. Загорская<sup>а, \*</sup>, Е. В. Дейнеко<sup>а, б</sup>

<sup>а</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”, Новосибирск, Россия

<sup>б</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Национальный исследовательский Томский государственный университет”, Томск, Россия

\*e-mail: zagorska@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 20.04.2020 г.

После доработки 17.06.2020 г.

Принята к публикации 19.06.2020 г.

Биопродукция рекомбинантных фармацевтических препаратов в растительных системах становится перспективной альтернативой существующим платформам на основе клеток млекопитающих или бактерий. Культивирование растительных клеток в контролируемых условиях биореакторов обеспечивает продукцию белка высокого качества в соответствии с нормами GMP (Good Manufacturing Practice), а быстрый рост клеток, невысокая стоимость компонентов питательных сред и полное отсутствие риска контаминации вирусами и прионами животного происхождения свидетельствуют о неоспоримом преимуществе растительных экспрессионных систем. В связи с одобрением контролирующими органами и последующей коммерциализацией первого в мире рекомбинантного фармацевтического препарата  $\beta$ -глюкоцереброзидазы для лечения болезни Гоше, синтезированного в растительных клетках, наступил новый период, в котором данная технология решительно тестирует некоторые устоявшиеся экспрессионные платформы на биофармацевтических рынках. В обзоре рассматриваются характеристики “идеальной” культуры растительных клеток для производства рекомбинантных белков *in vitro*, технологические особенности используемых в настоящее время биореакторных систем, обсуждаются проблемы, которые необходимо преодолеть для повышения конкурентоспособности данной платформы, а также освещаются последние коммерческие успехи молекулярного фермерства.

**Ключевые слова:** суспензионные культуры, растительные системы экспрессии, биореакторы, рекомбинантные белки, биофармацевтические препараты

**DOI:** 10.31857/S0015330321010218

### ВВЕДЕНИЕ

Молекулярное фермерство — это использование растений, растительных тканей и клеток для получения коммерчески значимых рекомбинантных белков, в том числе и медицинского назначения [1]. Коммерческий потенциал данной технологии стал очевиден после проведения многолетних исследований возможности использования растений для синтеза и накопления различных рекомбинантных белков, и, в частности, способности растений конкурировать с уже существующими экспрессионными системами на основе клеток млекопитающих, насекомых, дрожжей и микроорганизмов. Хотя преимущества растительных экспрессионных систем широко обсуждались, продвижение этих разработок происходило чрезвычайно медленно. Это объяснялось негативным восприятием общественностью технологий, связанных с генетически модифицированными культурами, а

также с инертностью и нежеланием производителей отходить от платформ с устоявшейся репутацией и существующей инфраструктурой. Отсутствовала также и нормативно-правовая база по вопросам использования растительных биотехнологических препаратов, в результате чего данные препараты попадали между юрисдикциями и компетенциями ответственных учреждений, занимающихся вопросами сельского хозяйства и вопросами производства биотехнологических препаратов. Однако на сегодняшний день наработка рекомбинантных белков в растительных системах является быстро развивающимся сегментом экономики. Крупнейшие биотехнологические и фармацевтические компании, такие как Protalix Biotherapeutics (Израиль), Synthon (Нидерланды), Ventry (США), Medicago (Канада), Greenovation (Германия), и Pfizer (США), проявляют огромную заинтересованность и инвестируют значительные

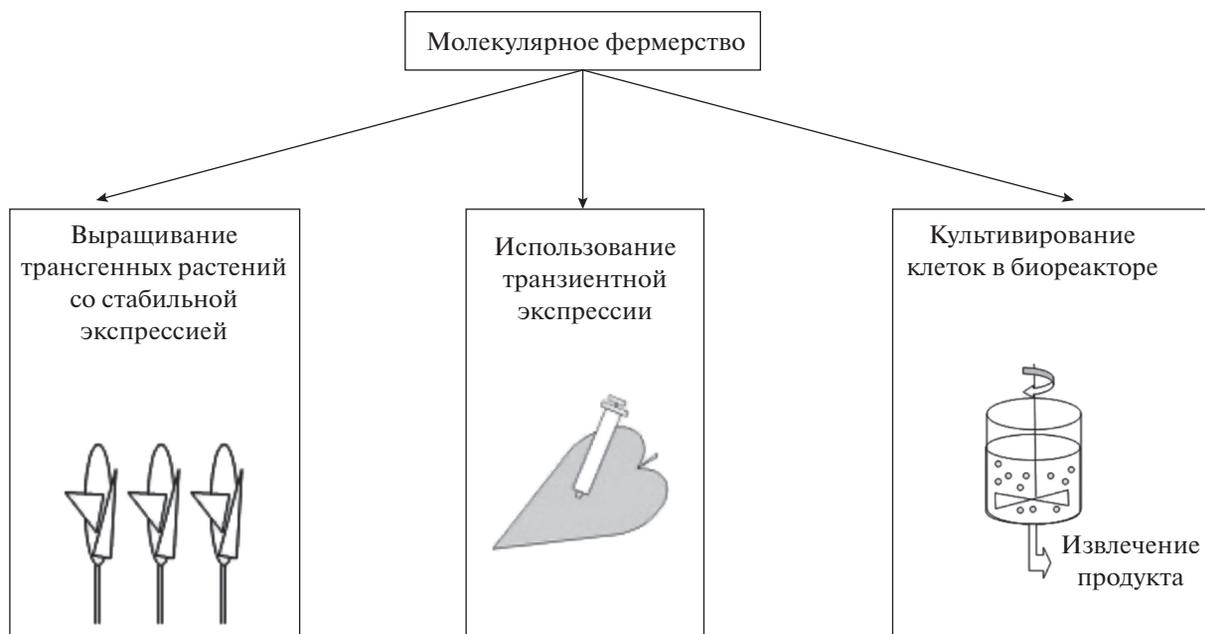


Рис. 1. Основные направления молекулярного фермерства.

средства в развитие научных исследований и разработку новых платформ для производства ценных рекомбинантных белков. На российском рынке преобладают импортные биотехнологические препараты. Тем не менее, в последние годы отечественные компании стали активно разрабатывать как новые биофармацевтические препараты, так и аналоги уже имеющихся зарубежных лекарственных средств, в том числе при финансовой поддержке государства. Хотя в настоящее время в России не ведется промышленного получения рекомбинантных белков в растительных экспрессионных системах, очевидно, что эта перспективная платформа скоро займет достойное место в современном производстве.

Современное молекулярное фермерство разделилось на три главных направления: выращивание растений со стабильной экспрессией трансгенов для масштабного производства белков в течение длительного периода, применение транзientной экспрессии для быстрого получения белков за короткое время и, наконец, использование для синтеза растительных клеток или тканей, культивируемых в биореакторах (рис. 1).

Выращивание растений со стабильной экспрессией трансгенов в полевых условиях с применением уже имеющихся агротехнических схем и приемов дает практически неограниченную масштабируемость при минимальных затратах [2]. Поэтому данное направление оптимально подходит для производства продуктов с большим объемом потребления, таких как ферменты и гормоны (например, липаза желудка и инсулин), а также

антитела и вакцины для профилактики заболеваний, особенно в развивающихся странах с большой численностью населения. Трансгенные растения также являются привлекательным средством для создания пероральных вакцин, поскольку антигены могут быть синтезированы в съедобных тканях [3], хотя существуют сомнения по поводу оптимального дозирования из-за вариабельности по содержанию рекомбинантного белка в растительных тканях. Первой крупной компанией, применившей растения для промышленного получения рекомбинантного белка, стала компания ProdiGeneInc. (США), которая использовала генетически модифицированную кукурузу для синтеза промышленных ферментов, реагентов для исследовательских работ и биофармацевтических препаратов. Важно отметить, что в компании ProdiGeneInc. впервые было проведено исследование экономической целесообразности молекулярного фермерства с учетом затрат на выращивание, выделение и очистку конечного рекомбинантного продукта [4, 5]. Было показано, что полученные из кукурузы рекомбинантный авидин и  $\beta$ -глюкуронидаза были доступны и конкурентоспособны по сравнению с существующими коммерческими продуктами авидина, полученными из куриных яиц [6], и  $\beta$ -глюкуронидазой бактериального происхождения [7]. Многие из концепций извлечения и очистки конечного продукта из растительной ткани, разработанных ProdiGeneInc., были в последующем использованы другими компаниями. В настоящее время одобрено производство в полевых условиях генетически модифицированных растений риса, в зернах которого синтезируются

рекомбинантные человеческие лизоцим [8], лактоферрин [9] и сывороточный альбумин [10], а также трансгенного сафлора, способного накапливать в семенах аполипопротеин [11] и поверхностный антиген гепатита В [12], и кукурузы (браззеин) [13, 14].

Второе направление современного молекулярного фермерства связано с наработкой в растениях рекомбинантных белков на основе транзientной экспрессии. Сжатые сроки производства белков и быстрое масштабирование делают данное направление привлекательным для крупного производства вакцин, особенно при необходимости экстренного реагирования. Подтверждением перспективности данной системы экспрессии для обеспечения быстрой вакцинации населения и защиты от вспышек заболеваний послужили работы D'Aoust с соавт. [15], когда в растениях *Nicotiana benthamiana* были продуцированы большие количества (50 мг/кг) антигенов из штаммов вируса гриппа H5N1 (птичий грипп) и H1N1 (свиной грипп) менее чем за 3 недели с момента определения последовательности вирусной РНК. Данные вакцины против гриппа завершили II фазу испытаний на людях. Компания Fraunhofer USA, Inc. также использовала транзientную трансформацию растений для ускоренного получения значительных количеств рекомбинантного белка на основе выделенной последовательности РНК вируса H1N1A [16, 17].

Первый экспериментальный “коктейль” против вируса Эбола, представляющий собой смесь из трех моноклональных антител, синтезированных посредством транзientной экспрессии в растениях *N. benthamiana*, был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA – Food and Drug Administration) на случай чрезвычайной ситуации и получил название ZMapp<sup>TM</sup> [18]. Перспективна эта платформа и для мелкосерийного производства персонализированных лекарственных препаратов, таких как анти-идиотипные антитела scFv для неходжкинской лимфомы, где инвестиции в крупномасштабные объекты были бы нерациональны.

Для доставки целевых генов в ткани растений разработаны системы агроинfiltrации с использованием вирусных векторов, например, вируса мозаики вигны РНК-2 от Sainsbury с соавт. [19], а также система “магнификации” (Icon-Genetics). Накопление целевого рекомбинантного белка в листьях *N. benthamiana* в таких системах может достигать 80% от общего растворимого белка (ОРБ) [20].

Следует отметить, что, несмотря на низкую стоимость полученных рекомбинантных белков при использовании трансгенных растений со стабильной экспрессией целевых генов, в настоящее время четко прослеживается тенденция переноса

производства биофармацевтических препаратов в ограниченные среды, то есть в системы на основе биореакторов [21, 22]. Культивирование в биореакторе полностью освобождает от проблем, связанных с изменениями погоды, почвы, наличием вредителей и дрейфом трансгенов в окружающую среду [23]. Из-за коротких циклов роста клеток, культивируемых в суспензии, сроки производства рекомбинантных белков в культуре растительных клеток, сокращаются до недель по сравнению с месяцами, необходимыми для их производства в целых трансгенных растениях [24]. Кроме того, выращивание растительных клеток в стерильных и контролируемых средах, таких как биореакторная система, позволяет точно регулировать условия роста клеток и качество продукта от партии к партии. Дополнительным преимуществом производства в культуре растительных клеток является тот факт, что рекомбинантные белки могут секретироваться из клеток в культуральные среды, и, следовательно, последующая обработка для извлечения и очистки белков становится намного дешевле, чем из целых растений. Эти преимущества значительно перевешивают недостаток, связанный с более низким выходом белка в системе растительных клеток по сравнению с другими платформами [25].

Таким образом, следующая волна фармацевтического молекулярного фермерства возникла в связи с разработкой производственных процессов, которые соответствовали жестким правилам, касающимся фармацевтических продуктов, и оказались экономичными в промышленном масштабе. Это привело к консолидации молекулярного фермерства вокруг меньшего числа наиболее перспективных производственных систем, центральное место среди которых заняли технологии, основанные на использовании суспензионных культур растительных клеток и полностью соответствующих существующим правилам GMP [26].

## ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

Первые разработки в области промышленного получения фармацевтически ценных рекомбинантных белков на платформе культур клеток высших растений были выполнены на клеточных линиях табака (*Nicotiana tabacum* L.): BY-2 (cv. BrightYellow-2) и NT-1, риса (*Oryza sativa* L.) и моркови (*Daucus carota* L.) (табл. 1). Эти культуры клеток являются быстрорастущими и легко подвергаются трансформации, опосредованной *Agrobacterium tumefaciens*. К тому же для клеток риса была создана сахароиндуцибельная протомоторная система, позволяющая разделять во времени фазы роста культуры и накопления продукта, что обеспечивало большую продуктивность. На основе клеточной линии табака BY-2 с использованием современного метода редактирования генома CRISPR/Cas9 и ме-

**Таблица 1.** Культуры клеток различных видов высших растений, используемые для крупномасштабного производства рекомбинантных белков

Растение-донор клеточной культуры	Клеточные линии	Компании-производители	Ссылки
Табак ( <i>N. tabacum</i> L.)	BY-2; NT-1	Protalix Biotherapeutics	<a href="http://protalix.com/faq/procellex-platform/">http://protalix.com/faq/procellex-platform/</a>
Морковь ( <i>D. carota</i> L.)		Protalix Biotherapeutics	<a href="http://protalix.com/faq/procellex-platform/">http://protalix.com/faq/procellex-platform/</a>
Рис ( <i>O. sativa</i> L.)		Natural Bio-Materials, Jeollabuk-do, Korea	<a href="http://www.nbms.co.kr">http://www.nbms.co.kr</a>

тодов гликоинженерии получена линия, в которой отсутствовало гликозилирование белков по растительному типу со специфичными для растений остатками  $\beta(1,2)$ -ксилозы и  $\alpha(1,3)$ -фукозы [27, 28].

В дополнение к этим трем коммерческим платформам в молекулярном фермерстве были использованы несколько других видов растений. Клетки люцерны усеченной (*Medicago truncatula* Gaertn.) обычно используют для анализа вторичного метаболизма, однако в последнее время было показано, что клеточные линии, полученные из зрелых семян, листьев, корней или проростков этого вида, обеспечивают высокий выход рекомбинантного белка за счет гораздо более низкого содержания протеаз, обнаруженных в среде после культивирования, чем в среде после культивирования клеток BY-2 [29]. К настоящему времени сообщается о двух биофармацевтических продуктах, синтезированных в клеточных линиях *M. truncatula* [30]. Другие белки были получены в линиях клеток томата (*Solanum lycopersicum* L.), сои (*Glycine max* L.), картофеля (*Solanum tuberosum* L.), подсолнечника (*Helianthus annuus* L.), сладкого картофеля (*Ipomoea batatas* L.) и лекарственных растений, таких как свободнаягодник колючий (*Eleutherococcus senticosus* Rupr. & Maxim.) и корейский женьшень (*Panax ginseng* C.A. Mey.). Однако данные линии используются лишь в исследовательских целях в рамках лабораторных экспериментов [31].

Стандартная схема получения трансгенных клеточных линий представлена на рисунке 2. На первом этапе проводят генетическую трансформацию растительных клеток методами агробактериальной трансформации или биобаллистики. Затем осуществляют индукцию трансгенного каллуса в том случае, если в качестве экспланта для трансформации были использованы дифференцированные ткани растения, или наращивание популяции трансгенных клеток при использовании клеточных суспензий. Индукция каллуса происходит благодаря добавлению в состав питательной среды соответствующих ростовых факторов (ауксинов и цитокининов), подобранных в определенных соотношениях. После проведения транс-

формации культура растительных клеток представляет собой гетерогенную массу генетически и эпигенетически отличающихся клеток с различными уровнями экспрессии, количеством копий трансгенов и разными инсерционными сайтами, что значительно влияет на их продуктивность. Только небольшая доля клеток из исходных трансформантов способна продуцировать рекомбинантный белок с высокой эффективностью, и важной задачей представляется селекция “элитных” высокопродуктивных клеток и использование их затем для формирования моноклональных суспензионных клеточных культур. Отбор продуктивных клеток может проводиться при использовании плейтинга — метода массового культивирования отдельных изолированных клеток с последующим определением уровня накопления белка в индивидуальных микрокалусах или с помощью методики флуоресцентно-активированной клеточной сортировки FACS (Fluorescence-activated cell sorting), позволяющей проводить отбор единичных протопластов с высоким уровнем экспрессии флуоресцентного маркера, слитого с целевым продуктом [32].

Идеальная растительная система для крупномасштабного производства рекомбинантных белков должна обладать следующими характеристиками: высокий темп роста; легкость генетической трансформации; высокий уровень продукции целевого белка; стабильность рекомбинантного целевого продукта и в процессе синтеза внутри клеток, и вне их; низкая концентрация вторичных метаболитов, способных вызывать изменения структурных и биологических свойств целевого белка и/или усложнять процессы выделения и очистки; корректность пост-трансляционных изменений в клетках, включая единые паттерны гликозилирования и конечный фолдинг белка; а также клеточная суспензия должна быть гомогенной и не содержать крупных агрегатов для стабильного функционирования биореакторов.

Если первые три требования к культурам растительных клеток не нуждаются в расшифровке, то на остальных необходимо остановиться подробнее.

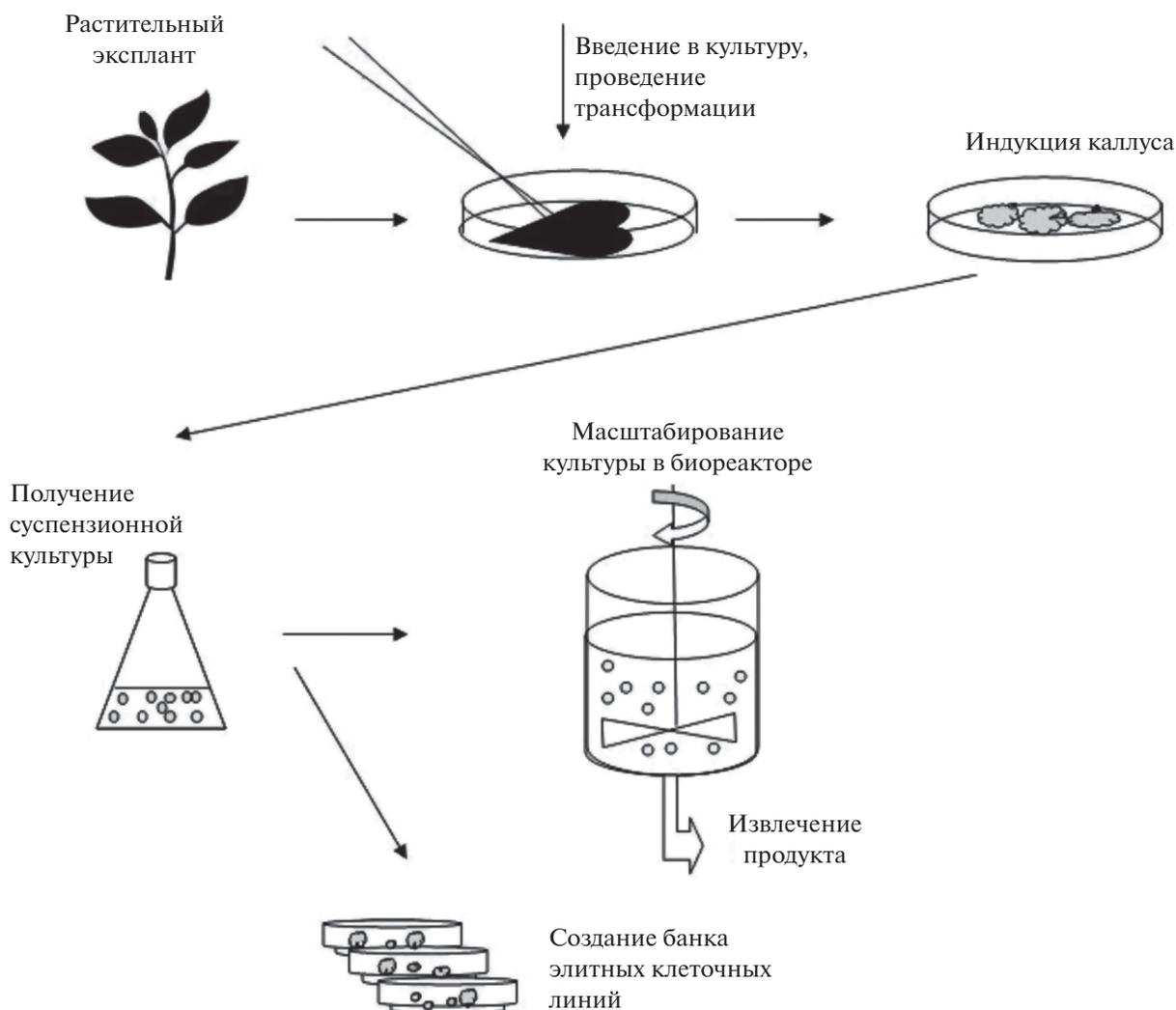


Рис. 2. Разработка трансгенных клеточных линий для производства целевого рекомбинантного белка.

### ПРОТЕОЛИЗ

Протеолиз — один из ключевых процессов, влияющих на качество и устойчивый уровень производства рекомбинантных белков в растительных клетках. Протеолитические ферменты участвуют во многих физиологических реакциях в клетке, и их количество и многообразие является серьезной проблемой при использовании суспензионных культур растительных клеток. На сегодняшний день разработано несколько стратегий для преодоления протеолитической деградации белковых молекул, таких как сайт-направленный мутагенез для удаления сайтов чувствительности к протеазам [33], присоединение сигналов накопления белка в клеточных компартаментах [34] или образование белковых телец включения для снижения протеолитической деградации [35]. Предложены технологии нарушения экспрессии генов протеаз с помощью антисмысловых последова-

тельностью ДНК или РНК [36, 37] или коэкспрессии ингибиторов протеаз с транспортом их в питательные среды [38–40].

### ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ

Известно, что выделение и очистка рекомбинантного белка из сырой биомассы является неотъемлемой частью любого биопроизводства, и независимо от выбранной платформы стоимость переработки достигает до 80% от общих затрат. Для каждого продукта разрабатывают специфические этапы выделения и очистки, хотя широко применяются и стандартизованные подходы, такие как аффинная хроматография или выделение с использованием фракционирования сульфатом аммония. Образование в культурах клеток вторичных метаболитов, таких как масла или алкалоиды, требует значительных дополнительных за-

трат на очистку продукта и представляется крайне нежелательным. Используемые в настоящее время в крупном промышленном производстве клеточные линии моркови и риса не содержат значительных количеств вторичных метаболитов, а линия табака ВУ-2 не продуцирует никотин, лишь небольшое количество анатабина и некоторых других алкалоидов [41].

## ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ

Одной из самых больших проблем при использовании растительных систем экспрессии остаются различия, существующие в гликозилировании по растительному типу и по типу клеток человека. Особенности гликоформы белка могут влиять на его фолдинг, агрегацию, устойчивость к протеолитической деградации, растворимость, транспорт, а также изменять его функциональную активность и иммуногенность [42]. Фармакологическая ценность рекомбинантных белков, синтезированных в растительных клетках и гликозилированных по растительному типу, снижается, а, следовательно, способность рекомбинантных систем экспрессии эффективно и корректно гликозилировать белки по человеческому типу является необходимой для производства современных фармакологических белков. К настоящему времени разрабатывается целый ряд стратегий для изменения ферментативных путей гликозилирования белков, синтезируемых в растительных системах экспрессии [43]. Наиболее простой подход к улучшению профиля гликозилирования рекомбинантного белка и его частичной гуманизации заключается в изменении его внутриклеточной адресации, например, в удерживании белка в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) с помощью добавления к нему С-терминальной сигнальной последовательности аминокислотных остатков Н/KDEL и SEKDEL или направлении его в аппарат Гольджи, вакуоли, хлоропласты и пр. [44, 45]. Однако эта стратегия является мало предсказуемой и подходит не для всех белков и не всех растительных систем экспрессии. Другая стратегия в гликоинженерии растительных систем экспрессии заключается в элиминировании растительных гликозилтрансфераз с помощью современной CRISPR/Cas9-технологии адресной модификации генов [46, 47]. В настоящее время основные усилия в гликоинженерии растений сосредоточены на сочетании приемов, которые обеспечивают ингибирование биосинтеза растительных гликоэпитопов с последующим переносом в растительный генном генов гликозилтрансфераз млекопитающих. Это дает возможность максимально приблизить картину гликозилирования рекомбинантных белков, синтезированных в растительных системах экспрессии, к человеческой [48].

## АГРЕГАТИВНОСТЬ

При создании высокопродуктивных клеточных суспензий важно поддержание клеточных культур в гомогенном состоянии для равномерного их снабжения питательными веществами и кислородом. Однако во время экспоненциальной фазы роста суспензии и интенсивного деления клеток формируются агрегаты разной величины, что приводит к появлению гетерогенных клеточных субпопуляций, различающихся морфологически и метаболически [49]. Клетки, находящиеся внутри больших агрегатов, ограничены в поступлении кислорода и питательных веществ, и, соответственно, в них снижается продукция рекомбинантного белка. Кроме того, с увеличением размера клеточных агрегатов возрастает их чувствительность к повреждениям при перемешивании среды, приводящая к гибели и лизированию клеток. Разрушение клеток при культивировании ведет не только к снижению продуктивной биомассы, но и к освобождению большого количества клеточных протеаз, вызывающее быструю деградацию целевого рекомбинантного продукта. Другой проблемой, связанной с образованием агрегатов, являются реологические проблемы и трудности перемешивания, так как крупные агрегаты обычно оседают на дно и стенки реакционного сосуда, блокируя отверстия и функциональные блоки биореактора [50]. Публикации разных лет подтверждают, что размер агрегатов в суспензионных культурах растительных клеток является ключевым параметром, определяющим их продуктивность в отношении синтеза вторичных метаболитов. Наиболее показательны исследования Kolewe с соавт. [51], в которых уменьшение размеров клеточных агрегатов сопровождалось резким возрастанием синтетических способностей растительных клеток в культуре *in vitro* не только в отдельных экспериментах, но и при длительном субкультивировании. Для разных видов растений описано как негативное, так и положительное влияние высокой степени агрегированности суспензионной клеточной культуры на уровень накопления вторичных метаболитов. Вероятно, что для каждого вида существует оптимальный диапазон размеров агрегатов, при котором биосинтетический потенциал клеток наиболее высок. Предполагается, что между продуктивностью процесса биосинтеза рекомбинантных белков и степенью агрегативности суспензионных культур существует обратная корреляция. В связи с этим, исследователями предпринимаются усилия для получения культур клеток с мелкими агрегатами. Предложены технологии механической фильтрации и отбора агрегатов при достижении ими критических размеров с последующим удалением их из биомассы, а также химические и ферментативные методы разделения клеточных агрегатов. Однако показано, что короткие импульсные обработки

ферментами, способные диссоциировать агрегаты, лишь незначительно повышают содержание в суспензии отдельных клеток [52], а продолжительные обработки приводят к лизису клеток [53]. Добавление в среду для культивирования ингибиторов полимеризации тубулина, подобных колхицину, запатентованное группой американских ученых [54], также не нашло применения в практике.

Перспективными работами по снижению агрегативности клеток в суспензионных культурах, можно считать, исследования, связанные с сайто-направленным нокаутингом при помощи системы CRISPR/Cas9 [55] гена галактуронозил-трансферазы-1 – одного из основных ферментов биосинтеза пектина [56]. Предполагается, что снижение функции данного гена приведет к уменьшению адгезионных свойств клеток, их способности образовывать крупные агрегаты и, следовательно, к повышению выхода рекомбинантного белка. Однако необходимо отметить, что ни один из описанных выше методов не является универсальным для клеток разных видов растений, и с их помощью невозможно добиться устойчивого состояния дезагрегации в суспензионной культуре без видимых изменений в ее биохимическом статусе.

#### ПРОБЛЕМЫ, ВОЗНИКАЮЩИЕ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

Описывая преимущества использования суспензионных культур растительных клеток при получении рекомбинантных белков в промышленных масштабах, необходимо отметить и те сложности, которые приходится преодолевать компаниям-разработчикам. Кроме уже упомянутой низкой производительности культур растительных клеток исследователи столкнулись с переменным качеством фармацевтических препаратов растительного происхождения. Это обусловлено тем, во время длительного культивирования и периодического субкультивирования происходит снижение или даже полное исчезновение ожидаемой продукции, связанное с замолканием генов или рекомбинационными событиями в клетках. Для решения этой проблемы и создания стабильного производства начали применять технологию сохранения элитных клеточных линий в так называемых клеточных банках, имеющих трехступенчатую систему и состоящих из клеточного банка, банка мастер-клеток и рабочего банка клеток. Элитные, высокоэффективные по синтезу целевого белка клеточные линии сохраняются по правилам GMP в замороженном состоянии. Линии клеток млекопитающих хранятся по так называемым золотым стандартам, позволяющим использовать общие стратегии криоконсервации. Свойства растительных клеток разнообразны, зависят от вида и требуют

разработки уникальных протоколов для разных клеточных линий [57, 58]. Эти протоколы основаны на трех главных принципах контролируемого охлаждения: двухступенчатое/равновесное замораживание, которое требует медленного охлаждения на 1°C в минуту до промежуточных низких температур (–30/–40°C) перед быстрым охлаждением в жидком азоте; обработка 5–8 молярными растворами криопротекторов, способствующая обезвоживанию перед сверхбыстрым охлаждением в жидком азоте, или высушивание с или без капсулирования в альгинатных гранулах. Успешно работающие протоколы были разработаны для различных видов растительных клеток, однако все они оптимизировались с использованием не-трансгенных клеток и оценивались по таким критериям, как клеточная морфология и рост культуры. Для трансгенных клеточных линий имеются лишь ограниченные данные, и существует необходимость оценки продуктивности этих клеток перед введением их в производство [59]. Альтернативный подход – постоянный скрининг высокопродуктивных линий, подтверждающих сохранение в культуре высокого уровня продукции рекомбинантного белка, и создание математических моделей, характеризующих стабильность продукции и обеспечивающих планирование работ. В дополнение к методам сохранения элитных линий разрабатываются методики коэкспрессии супрессоров генетического замолкания, способных поддерживать высокую продуктивность элитных клеточных линий.

Вторая проблема связана со сложностью масштабирования при переходе от лабораторных исследований к индустриальным технологиям промышленного культивирования растительных клеток. Разработка и оптимизация клеточной линии обычно осуществляется с использованием небольших сосудов, таких как микротитрационные планшеты, колбы или одноразовые биореакторы объемом 0.5 л. Культивирование же клеток в промышленности происходит в биореакторах, достигающих в объеме 25 тысяч литров и более. При использовании сосудов большого объема главной проблемой становится достаточная аэрация и перемешивание среды при отсутствии повреждений клеток, так как многие культуры оптимально растут в условиях повышенной плотности и вязкости, могут образовывать на поверхности пену [60] и часто обладают свойствами неньютоновских жидкостей [61]. Необходимо отметить, что в настоящее время для производства биофармацевтических продуктов используют реакторы как многофазового, так и однофазового действия. Многофазовые биореакторы требуют систематической обработки агрессивными реагентами во избежание контаминации. Эти реагенты достаточно дороги, а процедуры чистки и стерилизации занимают время. Поэтому в последние годы

все чаще применяют одноразовые, изготовленные из пластика биореакторы [62]. Одноразовые системы стоят дорого с точки зрения расходных материалов, но дополнительные расходы компенсируются экономией за счет отсутствия процедур чистки и стерилизации, а также снижения риска контаминации. Именно такие системы используют в производстве рекомбинантных белков фирмой Pfizer [63].

## ТИПЫ ПРОМЫШЛЕННЫХ БИОРЕАКТОРОВ

Конструкция оптимального биореактора должна учитывать несколько факторов, включая простоту процессов инокуляции и сбора продукта, масштабируемость, эффективность системы циркуляции питательной среды и аэрации и возможности стерилизации системы. При разработке биореакторов для конкретных задач биофарминга учитывают как важнейшие характеристики клеточных культур, например, кинетику или интенсивность роста клеточной культуры, так и свойства экспрессионного вектора, содержащего конститутивный или индуцируемый промотор, локализацию конечного продукта, его стабильность и многие другие характеристики растительной экспрессионной системы [64, 65]. Тип биореактора и особенности перемешивания определяются размерами клеток и клеточных агрегатов используемых клеточных культур, так как от них зависят реологические свойства культуры, потребность в питательных веществах и кислороде, а, в конечном итоге, и производительность биотехнологического процесса [66]. Растительные клетки имеют тенденцию переходить от сферических к удлиненным формам при прекращении клеточного деления, а также увеличиваться в размерах. Крупные клетки сильнее подвержены повреждению, а уменьшение перемешивания приводит к плохой подаче кислорода и питательных веществ в клеточную культуру, увеличивает слипание клеток в агрегаты и снижает производительность всей системы [67].

В настоящее время с целью создания оптимальных условий для клеточного роста и продукции рекомбинантных белков разработаны различные системы биореакторов (табл. 2). Как было сказано выше, используемые биореакторы делятся на реакторы многократного и однократного использования. Многократные реакторы чаще всего представляют собой стальной сосуд для культивирования, оснащенный системой стерилизации, и подразделяются на типы по способу перемешивания культуральной среды: оборудованные лопастями, пневматические, ротационные барабанные реакторы или реакторы с неподвижным слоем для иммобилизованных клеток. У всех перечисленных типов имеются как преимущества, так и недостатки. В ферментерах с лопастными

мешалками достигается хорошее перемешивание среды и аэрация, однако возникающая вокруг лопастей турбулентность может приводить к сильному повреждению клеток. Тем не менее, реакторы с механическим перемешиванием продолжают широко применяться и усовершенствоваться для достижения лучшей аэрации при низких скоростях движения лопастей. Для этого используются мешалки измененных конфигураций, такие как изогнутые дисковые турбины, подводные крылья, клеточный лифт. Разрабатываются новейшие системы аэрации, например, беспузырьковая аэрация с применением мембран, обеспечивающих поступление кислорода путем контролируемой диффузии [68]. Пневматические или пузырьковые биореакторы состоят из цилиндрического сосуда, в котором перемешивание и аэрация осуществляются с помощью сжатого воздуха или газовой смеси, поступающей с его дна. Такие реакторы отличает невысокая стоимость и отсутствие механических частей, однако в них невозможно достичь полной гомогенности культуры [69].

Реакторы с так называемым фиксированным слоем обычно используют для культивирования растительных клеток, дифференцированных растительных тканей или органов, иммобилизованных на микроносителях, расположенных в фиксированных зонах и гораздо менее чувствительных к механическому повреждению, чем при культивировании в суспензии. Питательная среда циркулирует сквозь слой клеток, и целевые продукты могут быть извлечены из нее по мере их накопления. Главным недостатком этой системы является недостаточная тепло- и элементная емкость, вызванная низкой скоростью обтекания жидкости. Подобные реакторы чаще применяются для перфузионного культивирования животных клеток, но при правильном выборе микроносителя для иммобилизации растительных клеток может быть достигнута их высокая плотность и, соответственно, повышение продуктивности культуры [70].

Биореакторы одноразового употребления имеют используемые однократно контейнеры для культивирования, изготовленные из пластика, отвечающего высоким критериям качества, утвержденным Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA). Такие реакторы все более широко используются в последнее десятилетие для биологических процессов в малых и средних объемах. Их широкое распространение объясняется низкими рисками контаминации, снижением временных затрат, минимизацией потерь и влияния на окружающую среду. Однако 20–30% снижение стоимости, о которой иногда сообщается, возможно только при высокоэффективном синтезе целевого продукта, что объясняется чрезвычайно высокой ценой GMP-контейнеров. Несмотря на этот факт, пластиковые контейнеры все более широко используются при

Таблица 2. Сравнение биореакторных систем для производства рекомбинантного белка растительными клеточными культурами

Характеристики	С мешалкой (STB)	Пузырьковая колонна	Аэрифт	Временные иммерсионные	STB одноразового использования	Волновой	Мембранный
Уровень повреждения клеток	Высокий	Низкий	Низкий	Низкий	Средний	Низкий	Низкий
Степень аэрации	Средняя	Высокая	Высокая	Низкая	Средняя	Низкая	Низкая
Период перемешивания	Короткий	Длинный	Средний	Длинный/средний	Средний	Средний	Средний
Сложность управления	Среднее	Простое	Простое	Сложное	Среднее	Среднее	Среднее
Масштабируемость	Средняя	Легкая	Легкая	Сложная	Средняя	Сложная	Сложная
Тип культуры	Суспензионные культуры	Суспензионные культуры	Суспензионные культуры	Иммобилизованные клетки	Суспензионные культуры	Суспензионные культуры	Иммобилизованные клетки
Плотность клеток	Низкая/средняя	Средняя	Средняя	Высокая	Низкая/средняя	Средняя	Высокая
Производительность	Средняя	Низкая	Средняя	Низкая средняя	Средняя	Средняя	Высокая
Мониторинг и контроль	Прямой, легкий, многократный	Прямой, легкий, многократный	Прямой, легкий, многократный	Косвенный, ограниченный	Прямой, легкий, ограниченный	Прямой, средний, ограниченный	Косвенный, ограниченный
Соответствие GMP	Да	Да	Да	Неполное	Да	Да	Неполное

культивировании растительных клеток для получения различных рекомбинантных белков и вторичных метаболитов [71].

В целом точная классификация многоцветных и систем однократного применения для культивирования растительных клеток сложна, так как существуют многочисленные варианты дизайна, приспособленные для определенных культур и операций. Поэтому в данном обзоре рассмотрены только коммерчески используемые типы реакторов.

### УСПЕХИ СОВРЕМЕННОЙ РАСТИТЕЛЬНОЙ БИОФАРМАЦЕВТИКИ

В последние годы РМР-сообщество (Plant-Made Pharmaceuticals) добилось значительного прогресса в разработке и получении рекомбинантных белков медицинского назначения. За 20–25 лет в культуре растительных клеток был успешно получен широкий спектр биологически значимых белков. К ним в основном относятся антитела, вакцинные антигены, гормоны и факторы роста, цитокины и ферменты. Из различных групп терапевтических белков, синтезируемых в системе культивируемых растительных клеток, наиболее востребованными остаются антитела. Антитела являются доминирующим классом рекомбинантных белков для фармацевтической промышленности, т.к. они относительно стабильны, накапливаются в высоких концентрациях (>100 мг/л), а также могут быть достаточно легко очищены от среды или клеточных экстрактов с помощью аффинной хроматографии [72].

На сегодняшний день разработаны технологии получения в растительных системах так называемых “специальных белков”, к которым относят, например, желатин и коллаген для капсулирования лекарств [73, 74], промышленные ферменты, такие как целлюлаза и липаза для производства биотоплива [75–79].

Несмотря на то, что культуры растительных клеток зарекомендовали себя в качестве многообещающей альтернативной платформы биопроизводства фармацевтических белков лишь несколько биотехнологических или фармацевтических компаний занимаются разработкой и коммерциализацией этой платформы. Важно отметить, что существует большой пласт перспективных разработок, способных обеспечить крупный прорыв в этой области в ближайшие годы, а некоторые биофармацевтические продукты уже одобрены для применения в медицине или проходят клинические и доклинические исследования. Так компания Dow AgroSciences разработала систему растительных клеток Concert™ в качестве передовой платформы для производства вакцинного антигена против вируса ньюкаслской болезни домашней

птицы. В январе 2006 года Dow AgroSciences получила разрешение на использование первой в мире вакцины, синтезированной растительными клетками (клетками табака BY-2) и представляющей собой рекомбинантный гликопротеин гемагглютинин-нейраминидазы, одного из поверхностных гликопротеинов вируса ньюкаслской болезни, и главный поверхностный антиген, индуцирующий продукцию нейтрализующих антител. Несмотря на то, что вакцина, полученная из растительных клеток, доказала свою эффективность и получила одобрение регулирующих органов, она осталась лишь проверкой концепции. Dow AgroSciences никогда не намеревалась продавать этот продукт и использовала эту вакцину для животных в качестве примера полного прохождения процесса. Однако компания проложила путь к будущим терапевтическим средствам на основе растительных клеток.

Биофармацевтическая компания Protalix Biotherapeutics ([www.protalix.com](http://www.protalix.com)) является наиболее успешной фирмой, использующей свою собственную запатентованную систему экспрессии ProCellEx® на основе растительных клеток для разработки и коммерциализации рекомбинантных биофармацевтических препаратов. Используя ProCellEx®, Protalix Biotherapeutics разрабатывает процессы производства новых рекомбинантных белков, предназначенные для крупных и устойчивых фармацевтических рынков. В мае 2012 года компания Protalix Biotherapeutics заключила партнерское соглашение с Pfizer для коммерциализации талиглоцеразы- $\alpha$  для инъекций (ELELYSO) – первого в мире человеческого терапевтического белка, получаемого в растительных клетках и одобренного FDA. Фермент используется для лечения болезни Гоше, наиболее распространенного заболевания, вызванного снижением активности лизосомального фермента кислой  $\beta$ -глюкоцереброзидазы, и накоплением в связи с этим глюкозилкерамида [80]. Талиглоцераза- $\alpha$  является активной рекомбинантной формой  $\beta$ -глюкоцереброзидазы, которая продуцируется в суспензионной культуре клеток корня моркови, культивируемых в одноразовой биореакторной системе. Данный продукт был разработан с использованием гена глюкоцереброзидазы человека (GCD) с заменой нативного сигнального пептида на сигнальный пептид эндохитиназного гена *A. thaliana* для перемещения в ЭПР, а также присоединением сигнала из хитиназы А табака для транспорта рекомбинантного белка в вакуоли [81]. В настоящее время основным вариантом лечения пациентов с тяжелой болезнью Гоше является энзимотерапия. С 1994 года для энзимотерапии использовался Cerezyme® – аналог человеческого фермента  $\beta$ -глюкоцереброзидазы, производимый компанией Genzyme в клетках млекопитающих СНО (Chinese hamster ovary). Поскольку для оптимальной активности фермента и нацеливания на мак-

рофаги требуется правильное гликозилирование  $\beta$ -глюкоцеребозидазы, функциональный фермент не может продуцироваться прокариотической кишечной палочкой [82]. Даже продуцируемая клетками СНО имиглюцераза должна подвергаться ферментативной обработке *in vitro*, чтобы сделать доступными концевые остатки маннозы, специфически распознаваемые эндоцитарными углеводными рецепторами на макрофагах для эффективного поглощения [83, 84]. Вырабатываемая растительными клетками глюкоцеребозидаза считается “биоподобной”, так как она структурно гомологична Cerezyme<sup>®</sup> с сопоставимой ферментативной активностью и поглощением в макрофагах [85]. Рекombинантный фермент не требует дополнительных модификаций для клинического применения после биопродукции, что приводит к значительному снижению затрат (примерно на 25%), по сравнению с затратами на производство его конкурента Cerezyme<sup>®</sup> [86]. Необходимо отметить, что одобрение данного препарата FDA в 2012 году явилось крупным прорывом, проложившим путь новым разработкам в области биофармацевтики.

Возможность пероральной доставки фармацевтических белков представляется желанной целью биофармацевтической промышленности. Перорально доставляемые белки обеспечивают более удобное введение лекарственного средства, чем некоторые существующие варианты доставки белков, включая внутривенные, внутримышечные и подкожные инъекции. Считается, что возможность пероральной доставки приведет к лучшим результатам лечения пациентов наряду с повышением качества их жизни. На сегодняшний день, успехи в разработке таких препаратов весьма ограничены из-за деградации белков в пищеварительном тракте. Однако, по мнению специалистов фирмы Protalix Biotherapeutics, такая возможность может быть реализована при синтезе белков на платформе ProCellEx<sup>®</sup>. При пероральном введении и прохождении через пищеварительный тракт растительные клетки функционируют в качестве естественного средства доставки благодаря защитным свойствам целлюлозной клеточной стенки. В настоящее время в компании Protalix Biotherapeutics на II стадии клинических испытаний находятся несколько продуктов, производимых на платформе ProCellEx<sup>®</sup> и предназначенных для перорального применения.

Дополнительные исследования проводятся для отработки пероральной доставки талиглюцеразы- $\alpha$  (продукт PRX-112) [87]. Эксперименты на животных и I этап клинических испытаний для изучения фармакокинетики PRX-112 и его безопасности, на котором пациенты с болезнью Гоше получали ресуспендированные лиофилизированные клетки-продуценты, показали присутствие

фермента в крови в период до 30 часов после перорального введения и среднее увеличение ферментативной активности более чем на 100% (в пределах от 50 до 350%). Таким образом, считают, что суточная доза PRX-112 позволит достичь устойчивого уровня ферментативной активности, обнаруженной у здоровых людей [88].

Продукт OPRX-106 представляет собой продуцируемый растительными клетками рецептор II рекомбинантного фактора некроза опухоли человека, слитый с Fc-доменом IgG1 (TNFRII-Fc) и предназначенный для ингибирования TNF- $\alpha$ . В настоящее время этот продукт прошел II фазу клинических испытаний при аутоиммунных воспалительных заболеваниях желудочно-кишечного тракта, включая язвенный колит и болезнь Крона [89]. Терапия основана на блокировании цитокина, вовлеченного в воспалительные реакции. Перорально вводимые клетки моркови, продуцирующие OPRX-106, могут быть использованы для лечения иммунных расстройств, а также в качестве противовоспалительного, противоревматического, гепатопротекторного средства. В ходе доклинической оценки этого продукта на мышах показано, что пероральное введение позволяет избежать системного воздействия, которое возникает при инъекции или внутривенной инфузии других ингибиторов TNF- $\alpha$ . Пероральное введение может потенциально привести к более безопасному использованию анти-TNF- $\alpha$ . OPRX-106 также является менее иммуногенным, что приводит к более длительному сроку эффективной терапии.

Еще одной успешной разработкой фирмы Protalix Biotherapeutics является модифицированная дезоксирибонуклеаза (ДНКазaI) человека, производимая клетками моркови [90]. Этот продукт, обозначенный PRX-110 и вводимый ингаляционно, предназначен для снижения вязкости мокроты, накапливающейся в легких у больных муковисцидозом. Традиционно терапия муковисцидоза для улучшения функции легких и уменьшения обострений проводится ДНКазой I (дорназой- $\alpha$ ). Однако активность ДНКазы I снижается из-за актина — глобулярного многофункционального белка, являющегося мощным ингибитором ДНКазы I и обнаруженного в высокой концентрации в мокроте пациентов с муковисцидозом. Для уменьшения взаимодействия актина и ДНКазы I специалисты фирмы Protalix Biotherapeutics разработали альдорназу- $\alpha$  — химическую модификацию фермента ДНКазы I, резистентную к ингибированию актином. Этот новый перспективный препарат, производимый на платформе клеток табака BY-2, может привести к улучшению функции легких и снижению заболеваемости рецидивирующими инфекциями у пациентов с муковисцидозом, а рекомбинантная форма фермента демонстрирует повышенную эффективность у пациентов по

сравнению с одобренным в настоящее время лечением ДНКазой (Pulmozyme®-дорназа-α). Первичные результаты II фазы клинических исследований показывают, что лечение альдорназой-α привело к клинически значимому улучшению функции легких, ее активность, как продемонстрировано в исследованиях *in vitro*, остается практически без изменений в концентрации актина, обнаруженной у пациентов с муковисцидозом, в то время как активность Pulmozyme® значительно снижается. Кроме того, PRX-110 продемонстрировал значительное ингибирование *Pseudomonas aeruginosa* — бактерий, которые широко распространены в окружающей среде и являются основной причиной легочных инфекций у пациентов с муковисцидозом. Количество колоний *P. aeruginosa* уменьшилось более, чем на 50% по сравнению с исходным уровнем. Это действие препарата PRX-110 представляется чрезвычайно ценным, так как хроническая легочная инфекция является основной причиной заболеваемости и смертности у пациентов с муковисцидозом, несмотря на активное использование антибиотиков.

Завершается II этап клинических исследований рекомбинантного биофармацевтика, продуцируемого в клетках табака, названного PRX-102 [91]. PRX-102 (pegunigalsidase alfa) представляет собой рекомбинантную химически модифицированную версию белка альфа — галактозидазы А и предназначен для лечения болезни Фабри, развитие которой связано со снижением ферментативной активности лизосом. PRX-105 (ацетилхолинэстераза человека; AChE-R) представляет собой еще один из рекомбинантных биофармацевтиков, синтезированных в растительных клетках с использованием системы ProCellEx®в компании Protalix Biotherapeutics [92]. В настоящее время данный препарат прошел доклинические испытания и первые оценки на людях, которые показали его безопасность и высокую переносимость. PRX-105 заявлен в качестве кандидата для профилактики и лечения отравлений теплокровных фосфорорганическими соединениями.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суспензионная культура клеток растений объединила преимущества недорогого микробного синтеза и достоинства эукариотической системы наработки рекомбинантного белка без риска контаминации инфекционными агентами животного происхождения. Первый в мире терапевтический препарат из растительных клеток β-глюкоцереброзидаза стал коммерческим успехом биофарминга, некоторые другие препараты проходят доклинические и клинические испытания. Следовательно, можно сказать, что биофармацевтическая промышленность вступила в период широкого использования уникальных свойств растительных

систем. Решающим моментом в продвижении этой технологии будет повышение уровня экспрессии рекомбинантного белка, обеспечение его секреции из клетки, а также осуществление гуманизации или использование специфических гликанов для повышения эффективности белка. Применение в крупномасштабном производстве высокоэффективных и безопасных биореакторов одноразового применения делает процесс полностью соответствующим высоким требованиям GMP.

Работа поддержана бюджетным проектом 0324-2019-0040-С-01 “Генетические основы биотехнологий и биоинформатика”.

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. *Tschofen M., Knopp D., Hood E., Stoger E.* Plant molecular farming: Much more than medicines // *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2016. V. 9. P. 271.
2. *Buyel J.F., Hubbuch J., Fischer R.* Comparison of tobacco host cell protein removal methods by blanching intact plants or by heat treatment of extracts // *J. Vis. Exp.* 2016. V. 114. <https://doi.org/10.3791/54343>
3. *Spiegel H., Stöger E., Twyman R.M., Buyel J.F.* Current status and perspectives of the molecular farming landscape. *Molecular Pharming // Molecular Pharming: Applications, Challenges, and Emerging Areas, First Edition / Ed. Kermode A.R.: John Wiley & Sons, Inc.* 2018. P. 3. <https://doi.org/10.1002/9781118801512.ch1>
4. *Hood E.E., Kusnadi A., Nikolov Z., Howard J.* Molecular farming of industrial proteins from transgenic maize // *Chemicals via Higher Plant Bioengineering / Eds. Shahidi F., Kolodziejczyk P., Whitaker J., Munguia A., Fuller G.: Plenum Publishers, New York.* 1999. P. 127.
5. *Kusnadi A.R., Evangelista R., Hood E., Howard J., Nikolov Z.* Processing of transgenic corn seed and its effect on the recovery of recombinant 13-glucuronidase // *Biotech. Engin.* 1998. V. 60. P. 44.
6. *Hood E.E., Witcher D.R., Maddock S., Meyer T., Baszczyński C., Bailey M., Flynn P., Register J., Marshall L., Bond D., Kulisek E., Kusnadi A., Evangelista R., Nikolov Z., Wooge C., et al.* Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification // *Mol. Breed.* 1997. V. 3. P. 291.
7. *Witcher D., Hood E., Peterson D., Bailey M., Bond D., Kusnadi A., Evangelista R., Nikolov Z., Wooge C., Mehigh R., Kappel W., Register J., Howard J.A.* Commercial production β-glucuronidase (GUS): a model system for the production of proteins in plants // *Molecular Breeding.* 1998. V. 4. P. 301.

8. Yang D., Guo F., Liu B., Huang N., Watkins S.C. Expression and localization of human lysozyme in the endosperm of transgenic rice // *Planta*. 2003. V. 216. P. 597.
9. Huang N., Bethell D., Card C., Cornish J., Marchbank T., Wyatt D., Mabery K., Playford R. Bioactive recombinant human lactoferrin, derived from rice, stimulates mammalian cell growth // *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2008. V. 44. P. 464.
10. Yang H., Ninga T., Xie T., Qiu Q., Zhanga L., Suna Y., Jianga D., Fua K., Yin F., Zhangb W., Shenc L., Wangc H., Lid J., Line Q., Sunf Y., et al. Large-scale production of functional human serum albumin from transgenic rice seeds // *PNAS*. 2011. V. 108. № 47. P. 19078.
11. Nykiforuk C.L., Shen Y., Murray E.W., Boothe J.G., Busseuil D., Rhéaume E., Tardif J.C., Reid A., Moloney M.M. Expression and recovery of biologically active recombinant apolipoprotein AI(Milano) from transgenic safflower (*Carthamus tinctorius*) seeds // *Plant Biotechnol. J.* 2011. V. 9. № 2. P. 250. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00546.x>
12. Valdés R., Reyes B., Alvarez T., García J., Montero J.A., Figueroa A., Gómez L., Padilla S., Geada D., Abrahantes M.C., Dorta L., Fernández D., Mendoza O., Ramirez N., Rodriguez M., et al. Hepatitis B surface antigen immunopurification using a plant-derived specific antibody produced in large scale // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 310. P. 742.
13. Azzoni A.R., Farinas C.S., Miranda E.A. Transgenic corn seed for recombinant protein production: relevant aspects on the aqueous extraction of native component // *J. Sci. Food Agr.* 2005. V. 85. P. 609.
14. Lee Y.R., Akter Sh., Lee I.H., Jung Y.J., Park S.Y., Cho Y.-G., Kang K.K., Jung Y.J. Stable expression of brazzein protein, a new type of alternative sweetener in transgenic rice // *J. Plant Biotechnol.* 2018. V. 45. P. 63. <https://doi.org/10.5010/JPB.2018.45.1.063>
15. D'Aoust M.A., Couture M.M., Charland N., Trépanier S., Landry N., Ors F., Vézina L.P. The production of hemagglutinin based virus-like particles in plants: A rapid, efficient and safe response to pandemic influenza // *Plant Biotechnol. J.* 2010. V. 8. № 5. P. 607.
16. Shoji Y., Chichester J.A., Bi H., Musiychuk K., de la Rosa P., Goldschmidt L., Horsey A., Ugulava N., Palmer G.A., Mett V., Yusibov V. Plant-expressed HA as a seasonal influenza vaccine candidate // *Vaccine*. 2008. V. 26. P. 23. P. 2930.
17. Shoji Y., Chichester J.A., Jones M., Manceva S.D., Damon E., Mett V., Musiychuk K., Bi H., Farrance C., Shamloul M., Kushnir N., Sharma S., Yusibov V. Plant-based rapid production of recombinant subunit hemagglutinin vaccines targeting H1N1 and H5N1 influenza // *Hum. Vaccin.* 2011. V. 7. P. 41.
18. Na W., Park N., Yeom M., Song D. Ebola outbreak in Western Africa 2014: What is going on with Ebola virus? // *Clin. Exp. Vaccine Res.* 2015. V. 4. P. 17.
19. Sainsbury F., Sack M., Stadlmann J., Quendler H., Fischer R., Lomonosoff G.P. Rapid transient production in plants by replicating and non-replicating vectors yields high quality functional anti-HIV antibody // *PLoS One*. 2010. V. 5. e13976
20. Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. Magniffection: a new platform for expressing recombinant vaccines in plants // *Vaccine*. 2005. V. 23. P. 2042.
21. Wilken L.R., Nikolov Z.L. Recovery and purification of plant-made recombinant proteins // *Biotechnology Advances*. 2012. V. 30. P. 419.
22. Basaran P., Rodríguez-Cerezo E. Plant molecular farming: opportunities and challenges // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2008. V. 28. № 3. P. 153. <https://doi.org/10.1080/07388550802046624>
23. Donini M., Marusic C. Current state-of-the-art in plant-based antibody production systems // *Biotechnol. Lett.* 2019. V. 41. № 3. P. 335. <https://doi.org/10.1007/s10529-019-02651-z>
24. Plasson C., Michel R., Lienard D., Saint-Jore-Dupas C., Sourrouille C., de March G.G., Gomord V. Production of recombinant proteins in suspension-cultured plant cells // *Methods Mol. Biol.* 2009. V. 483. P. 145.
25. Schillberg S., Raven N., Fischer R., Twyman R.M., Schiermeyer A. Molecular farming of pharmaceutical proteins using plant suspension cell and tissue cultures // *Curr. Pharm. Des.* 2013. V. 19. № 31. P. 5531.
26. Huang T.-K., McDonald K.A. Bioreactor systems for *in vitro* production of foreign proteins using plant cell cultures // *Biotechnology Advances*. 2012. V. 30. P. 398. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.016>
27. Ozawa K., Takaiwa F. Highly efficient Agrobacterium-mediated transformation of suspension-cultured cell clusters of rice (*Oryza sativa* L.) // *Plant Sci.* 2010. V. 179. № 4. P. 333.
28. Xu J., Ge X., Dolan M.C. Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures // *Biotechnol. Adv.* 2011. V. 29. № 3. P. 278.
29. Santos R.B., Chandrasekar B., Mandal M.K., Kaschani F., Kaiser M., Both L., van der Hoorn R.A.L., Schiermeyer A., Abranches R. Low protease content in *Medicago truncatula* cell cultures facilitates recombinant protein production // *Biotechnol. J.* 2018. V. 13. № 7: e1800050. <https://doi.org/10.1002/biot.201800050>
30. Pires A.S., Rosa S., Castanheira S., Fevereiro P., Abranches R. Expression of a recombinant human erythropoietin in suspension cell cultures of *Arabidopsis*, tobacco and *Medicago* // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2012. V. 110. P. 171. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0141-x>
31. Santos R.B., Abranches R., Fischer R., Sack M., Holland T. Putting the spotlight on plant suspension culture // *Front. Plant Sci.* V. 7. P. 297. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00297>
32. Kirchhoff J., Raven N., Boes A., Roberts J.L., Russell S., Treffenfeldt W., Fischer R., Schinkel H., Schiermeyer A., Schillberg S. Monoclonal tobacco cell lines with enhanced recombinant protein yields can be generated from heterogeneous cell suspension cultures by flow sorting // *Plant Biotechnol. J.* 2012. V. 10. P. 936.
33. Jutras P.V., Goulet M.-C., Lavoie P.-O., D'Aoust M.-A., Sainsbury F., Michaud D. Recombinant protein susceptibility to proteolysis in the plant cell secretory pathway is pH-dependent // *Plant Biotechnol. J.* 2018. V. 16. P. 1928.

34. Faye L., Boulaflous A., Benchabane M., Gomord V., Michaud D. Protein modifications in the plant secretory pathway: current status and practical implications in molecular pharming // *Vaccine*. 2005. V. 23. P. 770.
35. Conley A.J., Joensuu J.J., Richman A., Menassa R. Protein body-inducing fusions for high-level production and purification of recombinant proteins in plants // *Plant Biotechnol. J.* 2011. V. 9. P. 419.
36. Duwadi K., Chen L., Menassa R., Dhaubhadel S. Identification, characterization and down-regulation of cysteine protease genes in tobacco for use in recombinant protein production // *PLoS One*. 2015. V. 10: e0130556.
37. Mandal M.K., Fischer R., Schillberg S., Schiermeyer A. Biochemical properties of the matrix metalloproteinase NtMMP1 from *Nicotiana tabacum* cv. BY-2 suspension cell // *Planta*. 2010. V. 232. P. 899.
38. Goulet C., Khalf M., Sainsbury F., D'Aoust M.-A., Michaud D. A protease activity-depleted environment for heterologous proteins migrating towards the leaf cell apoplast // *Plant Biotechnol. J.* 2012. V. 10. P. 83.
39. Jutras P.V., D'Aoust M.-A., Couture M.M.-J., Vézina L.P., Goulet M.C., Michaud D., Sainsbury F. Modulating secretory pathway pH by proton channel co-expression can increase recombinant protein stability in plants // *Biotechnol. J.* 2015. V. 10. P. 1478.
40. Robert S., Jutras P.V., Khalf M., D'Aoust M.-A., Goulet M.-C., Sainsbury F., Michaud D. Companion protease inhibitors for the *in situ* protection of recombinant proteins in plants // *Meth. Mol. Biol.* 2016. V. 1385. P. 115.
41. Hashimoto S. Tobacco BY-2 cells // *Biotechnology in agriculture and forestry* / Ed. By Nagata T., Hasezawa S., Inze D. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg. 2004. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-10572-6>
42. Розов С.М., Пермякова Н.В., Дейнеко Е.В. Основные стратегии гликоинженерии растительных систем экспрессии для получения гуманизированных рекомбинантных фармацевтических белков // *Биохимия*. 2018. Т. 83. № 3. С. 328.
43. Schoberer J., Strasser R. Plant glyco-biotechnology // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2018. V. 80. P. 133. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.07.005>
44. Sriraman R., Bardor M., Sack M., Vaquero C., Faye L., Fischer R., Finnern R., Lerouge P. Recombinant anti-HCG antibodies retained in the endoplasmic reticulum of transformed plants lack core-xylose and core-alpha(1,3)-fucose residues // *Plant. Biotechnol. J.* 2004. V. 2. P. 279.
45. Triguero A., Cabrera G., Rodriguez M., Soto J., Zamora Y., Perez M., Wormald M.R., Cremata J.A. Differential N-glycosylation of a monoclonal antibody expressed in tobacco leaves with and without endoplasmic reticulum retention signal apparently induces similar *in vivo* stability in mice // *Plant. Biotechnol. J.* 2011. V. 9. P. 1120.
46. Merx S., Smargiasso N., Chaumont F., De Pauw E., Boutry M., Navarre C. Inactivation of the  $\beta(1,2)$ xylosyl transferase and the  $\alpha(1,3)$ fucosyltransferase genes in *Nicotiana tabacum* BY2 cells by a multiplex CRISPR/Cas9 strategy results in glycoproteins without plant specific glycans // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. P. 403. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00403>
47. Hanania U., Ariel T., Tekoah Y., Fux L., Gubbay Y., Weiss M., Oz D., Azulay Y., Turbovsky A., Forster Y., Shaaltiel Y. Establishment of a tobacco BY2 cell line devoid of plant specific xylose and fucose as a platform for the production of biotherapeutic proteins // *Plant Biotechnol. J.* 2017. V. 15. P. 1120.
48. Castilho A., Gattinger P., Grass J., Jez J., Pabst M., Altmann F., Gorfer M., Strasser R., Steinkellner H. N-glycosylation engineering of plants for the biosynthesis of glycoproteins with bisected and branched complex N-glycans // *Glycobiology*. 2011. V. 21. P. 813.
49. Kolewe M.E., Henson M.A., Roberts S.C. Characterization of aggregate size in *Taxus* suspension cell culture // *Plant Cell Rep.* 2010. V. 29. № 5. P. 485. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0837-5>
50. Ochoa-Villarreal M., Howat S., Hong S., Jang M.O., Jin Y.-W., Lee E.-K., Loake G.J. Plant cell culture strategies for the production of natural products // *BMB Rep.* 2016. V. 49. № 3. P. 149.
51. Kolewe M.E., Henson M.A., Roberts S.C. Analysis of aggregate size as a process variable affecting paclitaxel accumulation in *Taxus* suspension cultures // *Biotechnol. Prog.* 2011. V. 27. № 5. P. 1365. <https://doi.org/10.1002/btpr.655>
52. Lee T.J., Schultz R.W., Hanley-Bowdoin L., Thompson W.F. Establishment of rapidly proliferating rice cell suspension culture and its characterization by fluorescence-activated cell sorting analysis // *Plant Mol. Biol. Rep.* 2004. V. 22. P. 259.
53. Naill M.C., Roberts S.C. Culture of isolated single cells from *Taxus* suspensions for the propagation of superior cell populations // *Biotechnol. Lett.* 2005. V. 27. № 21. P. 1725.
54. Garrison R., Jayakumar S. *In vitro* methods for the induction and maintenance of plant cell lines as single suspension cells with intact cell walls // *Patent US 8206983 B2*. 2012
55. Сидорчук Ю.В., Шелокова А.С., Пермякова Н.В., Дейнеко Е.В. Исследование агрегативности суспензионной клеточной культуры *Arabidopsis thaliana* с нокаутом гена GAUT1 // *Гены и клетки*. 2018. Приложение № 2. с. 47.
56. Sterling J.D., Atmodjo M.A., Inwood S.E., Kumar Kolli V.S., Quigley H. F., Hahn M. G., Mohnen D. Functional identification of an *Arabidopsis* pectin biosynthetic homogalacturonan galacturonosyltransferase // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006. V. 103. № 13. P. 5236. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600120103>
57. Grout B.W.W. Cryopreservation of plant cell suspensions // *Methods Mol. Biol.* 2007. V. 368. P. 153.
58. Mustafa N.R., de Winter W., van Iren F., Verpoorte R. Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures // *Nat. Protoc.* 2011. V. 6. P. 715.
59. Schmale K., Rademacher T., Fischer R., Hellwig S. Towards industrial usefulness: cryo-cell-banking of transgenic BY-2 cell cultures // *J. Biotechnol.* 2006. V. 124. P. 302.
60. Wongsamuth R., Doran P.M. Foaming and cell flotation in suspended plant-cell cultures and the effect of chemical antifoams // *Biotechnol. Bioeng.* 1994. V. 44. P. 481.

61. *Kieran P.M., MacLoughlin P.F., Malone D.M.* Plant cell suspension cultures: Some engineering considerations // *J. Biotechnol.* 1997. V. 59. P. 39.
62. *Raven N., Schillberg S., Kirchoff J., Brandli J., Imseng N., Eibl R.* Growth of BY-2 suspension cells and plantibody production in single-use bioreactors // *Single-use technology in biopharmaceutical manufacture* / Eds. Eibl R., Eibl D. John Wiley & Sons: Hoboken, NJ. 2011. P. 251.
63. *Schillberg S., Raven N., Fischer R., Twyman R.M., Schirmeyer A.* Contained molecular farming using plant cell and tissue cultures // *Applied Bioengineering* / Ed. Yoshida T. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2017. P. 259.  
<https://doi.org/10.1002/9783527800599.ch9>
64. *Georgiev M.I., Weber J.* Bioreactors for plant cells: hardware configuration and internal environment optimization as tools for wider commercialization // *Biotechnol Lett.* 2014. V. 6. № 7. P. 1359.
65. *Valdiani A., Hansen O.K., Nielsen U.B., Johannsen V.K., Shariat M., Georgiev M.I., Omidvar V., Ebrahimi M., Tavakoli Dinanai E., Abiri R.* Bioreactor-based advances in plant tissue and cell culture: challenges and prospects // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2018. V. 15. P. 11.  
<https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1489778>
66. *Kieran P.M.* Bioreactor design for plant cell suspension cultures // *Multiphase bioreactor design* / Eds. Cabral J., Mota M., Tramper J.: Taylor and Francis, London. 2001. P. 391.
67. *Kieran P., Malone D., MacLoughlin P.* Effects of hydrodynamic and interfacial forces on plant cell suspension systems // *Influence of stress on cell growth and product formation* / Eds. Schügerl K., Kretzmer G.: Springer, Berlin, Heidelberg. 2000. P. 139.
68. *AL-Mashhadania M.K.H., Wilkinson S.J., Zimmerman W.B.* Airlift bioreactor for biological applications with microbubble mediated transport processes // *Chemical Engineering Science.* 2015. V. 137. P. 243.
69. *Eibl R., Eibl D.* Design of bioreactors suitable for plant cell and tissue cultures // *Phytochem. Rev.* 2008. V. 7. P. 593.
70. *Medina-Bolivar F., Cramer C.* Production of recombinant proteins by hairy roots cultured in plastic sleeve bioreactors // *Methods Mol. Biol.* 2004. V. 267. P. 351.
71. *Shaaltiel Y., Baum G., Bartfeld D., Hashmueli S., Lewkowicz A.* Production of high mannose proteins in plant culture // *United States Patent 20080038232.* 2008
72. *Xu J., Zhang N.* On the way to commercializing plant cell culture platform for biopharmaceuticals: present status and prospect // *Pharm. Bioprocess.* 2014. V. 2. № 6. P. 499.
73. *Dodge C.N., McDonald K.A., Sudarshana M.R., Baez J.* Production of recombinant human gelatin in rice cell cultures // *AIChE Annual Meeting.* 2006.
74. *Shoseyov O., Posen Y., Grynszan F.* Human collagen produced in plants: more than just another molecule // *Bioengineered.* 2014. V. 5. № 1. P. 49.  
<https://doi.org/10.4161/bioe.26002>
75. *Zhang D., VanFossen A., Pagano R., Johnson J., Parker M., Pan S., Gray B.N., Hancock E., Hagen D.J., Lucero H.A., Shen B., Lessard P.A., Ely C., Moriarty M., Ekborg N.A., et al.* Consolidated pretreatment and hydrolysis of plant biomass expressing cell wall degrading enzymes // *Bio-Energy Res.* 2011. V. 4. P. 276.
76. *Sainz M.* Commercial cellulosic ethanol: The role of plant-expressed enzymes // *Vitr. Cell Dev. Biol. Plant.* 2009. V. 45. P. 314.
77. *Garvey M., Klose H., Fischer R., Lambert C., Commandeur U.* Cellulases for biomass degradation: Comparing recombinant cellulase expression platforms // *Trends Biotechnol.* 2013. V. 10. P. 581.
78. *Abdeev R.M., Musiichuk K.A., Goldenkova I.V., Sotchenkov D.V., Salekhi Dzhuzani G.R., Alyavina A.K., Zagorskina N.V., Piruzjan E.S.* Morphology and phytohormone content in transgenic tobacco plants expressing bacterial thermostable cellulose // *Russ. J. Plant Physiol.* 2004. V. 51. P. 642.
79. *Klose H., Gün M., Usade B., Fischer R., Commandeur U.* Cell wall modification in tobacco by differential targeting of recombinant endoglucanase from *Trichoderma reesei* // *BMC Plant Biology.* 2015. V. 15. P. 54.  
<https://doi.org/10.1186/s12870-015-0443-3>
80. *Grabowski G.A.* Lysosomal storage disease 1 – Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease // *Lancet.* 2008. V. 372. № 9645. P. 1263.
81. *Rosales-Mendoza S., Tello-Olea M.A.* Carrot cells: a pioneering platform for biopharmaceuticals production // *Mol. Biotechnol.* 2015. V. 57. № 3. P. 219.  
<https://doi.org/10.1007/s12033-014-9837-y>
82. *Wilson S.A., Roberts S.C.* Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules // *Plant Biotechnol. J.* 2012. V. 10. № 3. P. 249.
83. *Schillberg S., Raven N., Fischer R., Twyman R.M., Schirmeyer A.* Molecular farming of pharmaceutical proteins using plant suspension cell and tissue cultures // *Curr. Pharm. Des.* 2013. V. 19. № 31. P. 5531.
84. *Friedman B., Vaddi K., Preston C., Mahon E., Cataldo J.R., McPherson J.M.* A comparison of the pharmacological properties of carbohydrate remodeled recombinant and placental-derived beta-glucocerebrosidase: implications for clinical efficacy in treatment of Gaucher disease // *Blood.* 1999. V. 93. № 9. P. 2807.
85. *Aviezer D., Brill-Almon E., Shaaltiel Y., Hashmueli S., Bartfeld D., Mizrahi S., Liberman Y., Freeman A., Zimran A., Galun E.* A plant-derived recombinant human glucocerebrosidase enzyme – a preclinical and phase I investigation // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 3: e4792.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004792>
86. *Shaaltiel Y., Bartfeld D., Hashmueli S., Baum G., Brill-Almon E., Galili G., Dym O., Boldin-Adamsky S.A., Silman I., Sussman J.L., Futerman A.H., Aviezer D.* Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system // *Plant Biotechnol. J.* 2007. V. 5. № 5. P. 579.
87. *Shaaltiel Y., Gingis-Valitski S., Tzaban S., Fiks N., Tekoah Y., Aviezer D.* Plant-based oral delivery of  $\beta$ -glucocerebrosidase as an enzyme replacement therapy for Gaucher's disease // *Plant Biotechnol. J.* 2015. V. 8.

- P. 1033.  
<https://doi.org/10.1111/pbi.12366>
88. Protalix BioTherapeutics initiates phase II study with PRX-112, an orally-administered enzyme replacement therapy for the treatment of Gaucher disease // Press Release by Protalix BioTherapeutics, Inc., 2018. <https://protalixbiotherapeutics.gcs-web.com/node/6796/pdf>
89. Protalix BioTherapeutics announces additional positive results from final analysis of the phase II clinical trial of OPRX-106 for the treatment of ulcerative colitis // Press Release by Protalix BioTherapeutics, Inc., 2018. <https://protalixbiotherapeutics.gcs-web.com/node/10911/pdf>
90. *Tekoah Y., Shulman A., Kizhner T., Ruderfer I., Fux L., Nataf Y., Bartfeld D., Ariel T., Gingis-Velitski S., Hanaia U., Shaaltiel Y.* Large-scale production of pharmaceutical proteins in plant cell culture-the Protalix experience // *Plant Biotechnol. J.* 2015. V. 13. № 8. P. 1199. <https://doi.org/10.1111/pbi.12428>
91. *Kizhner T., Azulay Y., Hainrichson M., Tekoah Y., Arvatz G., Shulman A., Ruderfer I., Aviezer D., Shaaltiel Y.* Characterization of a chemically modified plant cell culture expressed human  $\alpha$ -Galactosidase-A enzyme for treatment of Fabry disease // *Mol. Genet. Metab.* 2015. V. 14. № 2. P. 259. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2014.08.002>
92. *Atsmon J., Brill-Almon E., Nadri-Shay C., Chertkoff R., Alon S., Shaikevich D., Volokhov I., Haim K.Y., Bartfeld D., Shulman A., Ruderfer I., Ben-Moshe T., Shilovitzky O., Soreq H., Shaaltiel Y.* Preclinical and first-in-human evaluation of PRX-105, a PEGylated, plant-derived, recombinant human acetylcholinesterase-R // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2015. V. 287. № 3. P. 202

УДК 581.1, 581.17

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БИОСИНТЕЗА НАТУРАЛЬНОГО КАУЧУКА

© 2021 г. А. Ю. Америк<sup>a, \*</sup>, Ю. Ц. Мартиросян<sup>a, b</sup>, Л. Ю. Мартиросян<sup>a</sup>,  
В. М. Гольдберг<sup>a</sup>, К. Р. Утеулин<sup>d</sup>, С. Д. Варфоломеев<sup>a, c</sup>

<sup>a</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт биохимической физики  
им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>b</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт  
сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

<sup>c</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

<sup>d</sup>Республиканское государственное предприятие Институт биологии и биотехнологии растений  
Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан, Алматы, Казахстан

\*e-mail: amerik.alexander@gmail.com

Поступила в редакцию 06.02.2020 г.

После доработки 03.05.2020 г.

Принята к публикации 18.06.2020 г.

Натуральный каучук, цис-1,4-полиизопрен, — незаменимый исходный материал для тысяч продуктов, многие из которых абсолютно необходимы, в частности, для современной медицины. Каучук находится в латексе водной эмульсии, содержащейся в специализированных структурах каучук производящих растений — латиферах. Более 2500 видов растений способны синтезировать натуральный каучук, однако в настоящее время *Hevea brasiliensis* (Бразильское каучуковое дерево, гевея) является единственным коммерчески значимым сырьем для получения каучука. Несколько белков играют ключевую роль в биосинтезе натурального каучука. Среди них цис-пренилтрансферазы, активатор цис-пренилтрансфераз и малые белки, ассоциированные с каучуковыми частицами. Эти белки непосредственно участвуют в синтезе полиизопреновой цепи. В этом обзоре мы анализируем молекулярно-генетические аспекты функционирования этих белков в процессе биосинтеза натурального каучука. В частности, мы описываем клонирование, экспрессию и функциональный анализ генов цис-пренилтрансфераз из *Arabidopsis thaliana*, *Hevea brasiliensis* и *Taraxacum kok-saghyz* и исследуем роль малых белков, ассоциированных с каучуковыми частицами, в биосинтезе натурального каучука. Особое внимание мы уделяем анализу влияния уровня экспрессии генов цис-пренилтрансфераз и гена-активатора цис-пренилтрансфераз на продукцию натурального каучука в клетках растений.

**Ключевые слова:** натуральный каучук, каучуковые частицы, кок-сагыз, цис-пренилтрансферазы, активатор цис-пренилтрансфераз, малые белки, ассоциированные с каучуковыми частицами, ПЦР с обратной транскрипцией

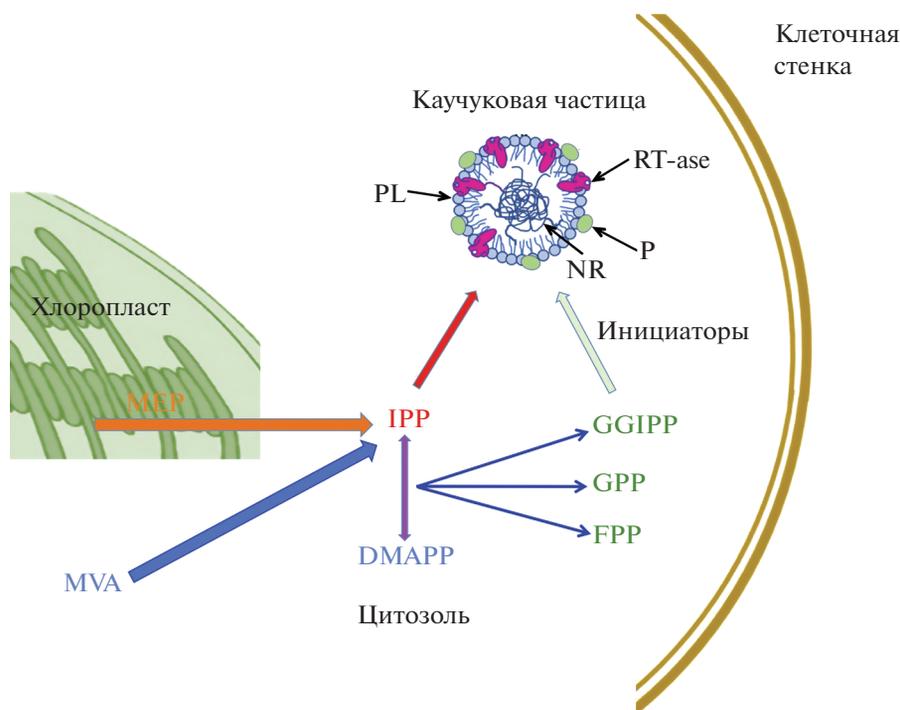
DOI: 10.31857/S0015330321010036

### ВВЕДЕНИЕ

Натуральный каучук — один из важнейших биополимеров, которые востребованы в промышленности и медицине [1–4]. Несмотря на то,

что каучук синтезируется более чем в 2500 видах растений, *Hevea brasiliensis* (Бразильское каучуковое дерево, гевея) в настоящий момент является единственным коммерчески значимым источни-

**Сокращения:** ГПХ — гель проникающая хроматография; кДНК — комплементарная ДНК; EX — эксклюзионная хроматография; ЭПР — эндоплазматический ретикулум; АСРТ — цис-пренилтрансфераза *Arabidopsis thaliana*; APP — аллил пиррофосфат; BiFC — бимолекулярный флуоресцентный комплементационный анализ; CLSM — конфокальная лазерная сканирующая микроскопия; СРТ — цис-пренилтрансфераза; EST — экспрессированные последовательности (от expressed sequence tag); 5-FOA — 5-фтороротовая кислота; FPP — фарнезил пиррофосфат; FRET — флуоресцентный резонансный перенос энергии; GGPP — геранил-геранил пиррофосфат; HRT1 и HRT2 — цис-пренилтрансферазы гевеи 1 и 2; IPP — изопентенил пиррофосфат; mRFP — мономерный красный флуоресцентный белок; NgBR — Nogo-B рецептор; ORF — открытая рамка считывания; RNAi — РНК-интерференция; RT — каучуковые трансферазы; RT-PCR — ПЦР с обратной транскрипцией; SRPP — малый белок, ассоциированный с каучуковыми частицами; TbRTA — активатор цис-пренилтрансферазы *Taraxacum brevicorniculatum*; TEM — электронная трансмиссионная микроскопия; TPT — транс-пренилтрансферазы; WBP — промытые каучуковые частицы.



**Рис. 1.** Биосинтез натурального каучука в растениях. Показаны метаболические пути биосинтеза субстрата и их внутриклеточная локализация. Изопентенилпирофосфат (IPP), мономерная единица для биосинтеза, синтезируется посредством двух метаболических путей – цитозольного пути мевалоновой кислоты (MVA) и пластидного метилэритрилолфосфатного (MEP) пути. IPP и его стереоизомер диметилаллилпирофосфат (DMAPP) конденсируются с образованием нескольких аллильных пирофосфатов (APP): геранил пирофосфата (GPP), фарнезил пирофосфата (FPP) и геранил геранил пирофосфата (GGPP). Эти APP выполняют роль инициаторов биосинтеза. Биосинтез катализируется комплексом каучуковых трансфераз (RT-ase) связанным с протеолипидной мембраной (PL) цитозольных каучуковых частиц, стабилизируемых вспомогательными белками (P). Натуральный каучук (NR) накапливается внутри каучуковых частиц.

ком каучука [5]. Ежегодно увеличивается спрос на натуральный каучук, но есть опасения, что современные плантации деревьев гевеи в дальнейшем не смогут удовлетворить все возрастающие потребности. Кроме того, гевея бразильская подвержена действию фитопатогенных грибов и бактерий, которые частично или полностью уже уничтожили огромные производственные плантации Бразилии. Следует также отметить, что многократный контакт с некоторыми белками латекса гевеи приводит к аллергической сверхчувствительности первого типа [6]. По этой причине идет активный поиск других семейств и видов каучуконосных растений, которые могут быть использованы в промышленном производстве натурального каучука. Исследуются растения, которые могут быть альтернативными продуцентами натурального каучука, из них выделяются растения рода одуванчик: кок-сагыз (*Taraxacum kok-saghyz*) [4, 5, 7–10]. Значительные количества каучука производят также растения гваюлы (*Parthenium argentatum*) [5, 11–13]. Таким образом, основной задачей становится изучение факторов, влияющих и на биосинтез натурального каучука, и на повышение продуктивности каучуконосных растений.

Целью настоящего обзора является анализ и обобщение данных по регуляции биосинтеза натурального каучука, понимание механизмов взаимодействия ключевых ферментов и белков-регуляторов. Внутриклеточными белками, необходимыми для биосинтеза натурального каучука (рис. 1), в частности, являются цис-пренилтрансферазы, малые белки, ассоциированные с каучуковыми частицами, и активаторы цис-пренилтрансфераз [14, 15]. В нашем недавнем обзоре мы подробно описали механизм биосинтеза натурального каучука и его регуляцию этими факторами [16]. В данном обзоре мы уделяем основное внимание молекулярно-генетическим аспектам этого процесса.

### ЦИС-ПРЕНИЛТРАНСФЕРАЗЫ КАУЧУКОВЫХ ЧАСТИЦ, СИНТЕЗИРУЮЩИЕ ПОЛИИЗОПРЕН

Цис-пренилтрансферазы каучуковых частиц, синтезирующие полиизопрен (каучуковые трансферазы, RT) могут быть выделены в отдельное подсемейство цис-пренилтрансфераз (CPT) [17–19]. Они обладают низкой аффинностью к изопентенилпирофосфату (IPP), что предотвращает синтез на-

турального каучука при низкой концентрации субстрата. Натуральный каучук эффективно синтезируется только в присутствии избытка IPP [20–23]. Различные классы СРТ отличаются клеточной локализацией, способностью связывать молекулы субстрата и размером продуктов реакции. Примечательно, что только ферменты RT класса способны синтезировать высокомолекулярный полиизопрен [22–26].

#### Клонирование, экспрессия и функциональный анализ кДНК цис-пренилтрансферазы *Arabidopsis thaliana*

Цис-пренилтрансфераза *Arabidopsis thaliana* (АСРТ) является первой охарактеризованной растительной СРТ. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с использованием праймеров, соответствующих консервативным участкам аминокислотных последовательностей СРТ микроорганизмов (*Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*), привела к амплификации фрагмента размером 500 п.о. Этот фрагмент был использован для скрининга кДНК библиотеки, который привел к изоляции полноразмерной кДНК АСРТ размером 1062 п.о., содержащей открытую рамку считывания (ORF) размером 909 п.о. Эта рамка кодирует потенциальный белок с молекулярной массой 33 кДа. Анализ предсказанной аминокислотной последовательности показал, что на N-конце АСРТ находится трансмембранный домен. Интересно, что СРТ из *M. luteus*, *E. coli* и *S. cerevisiae* не имеют подобного домена [27].

АСРТ экспрессируется во всех исследованных тканях, однако уровни экспрессии существенно различаются. Так, экспрессия АСРТ в корнях и листьях существенно выше, чем в стеблях и цветках. Следует также отметить, что независимо от исследуемой ткани, уровень экспрессии АСРТ очень низок в растениях *A. thaliana*.

АСРТ была оверэкспрессирована в клетках *E. coli* с использованием рЕТ-22b(+) системы. После добавления индуктора (IPTG) интенсивная полоса ожидаемого размера (36 кДа) была видна в экстрактах белков *A. thaliana*. Фермент был очищен до практически гомогенного состояния с использованием метал-аффинной хроматографии.

Стандартный анализ СРТ активности с использованием IPP и фарнезил пирофосфата (FPP) в качестве субстратов показал линейное включение [<sup>14</sup>C] IPP в синтезируемую полиизопреновую цепь в течение 3 ч. Для этого процесса также необходимы ионы Mg<sup>2+</sup> кофактора СРТ. Таким образом, АСРТ действительно является цис-пренилтрансферазой.

Субстратная специфичность АСРТ была исследована с использованием различных концентраций аллил пирофосфатов (APP). Включение [<sup>14</sup>C] IPP в случае FPP было значительно выше по

сравнению с включением в случае геранил-геранил пирофосфата (GGPP) (Supplementary Fig. S1). Таким образом, FPP является более эффективным субстратом для АСРТ по сравнению с GGPP.

Для того чтобы определить, способна ли АСРТ катализировать образование высокомолекулярных полиизопренов, подобных натуральному каучуку, продукты реакции анализировали методом геля проникающей хроматографии (ГПХ). Было показано, что основным реакционным продуктом является полиизопрен с числом атомов углерода около 120. Таким образом, вполне вероятно, что для синтеза высокомолекулярных полиизопренов в клетках *A. thaliana* необходимы дополнительные белковые факторы.

Интересно, что 290 аминокислотных остатков последовательности АСРТ идентичны остаткам предсказанного белка VAC F26B6, ген которого расположен на хромосоме II. Более того, АСРТ высокоомологична предсказанному белку MJB20, ген которого также расположен на хромосоме II.

#### Характеризация кДНК, кодирующих цис-пренилтрансферазы *Hevea brasiliensis*

Как было отмечено выше, гевея (*H. brasiliensis*) является единственным коммерчески значимым источником натурального каучука благодаря высокому выходу и превосходным физическим качествам продукта [5]. Каучук из гевеи представляет собой высокомолекулярный полимер, состоящий из изопреновых мономеров, соединенных между собой в цис-конфигурации. Молекулы натурального каучука синтезируются и хранятся в так называемых каучуковых частицах в специфических клетках латекса — латициферах [28]. Таким образом, изучение белков, участвующих в биосинтезе натурального каучука из гевеи, в частности цис-пренилтрансфераз (HRT), безусловно, является актуальной задачей.

Для клонирования кДНК кодирующих HRT1 и HRT2 были использованы вырожденные праймеры, соответствующие консервативным регионам I и V охарактеризованных СРТ (Supplementary Fig. S2) [29]. ПЦР с обратной транскрипцией (RT-PCR) с использованием этих праймеров привел к амплификации продуктов длиной приблизительно 600 п.о. Эти фрагменты были клонированы в вектор рT7BlueT, и один из них, содержащий консервативные мотивы II, III и IV, был назван LT600. Нуклеотидная последовательность этого фрагмента была использована для синтеза праймеров, необходимых для амплификации 5'- и 3'-концов кДНК HRT с использованием 5'- и 3'-RACE стратегий. Амплификация 3'-концевых продуктов привела к двум фрагментам кДНК размером 689 и 557 п.о. со степенью идентичности 85%. Интересно, что последовательности были идентичны в

районе 3'-концов предполагаемых ORF. Амплификация 5'-концевых продуктов привела к единственному фрагменту размером 424 п.о. Для получения полноразмерных кДНК были использованы праймеры, синтезированные на основании данных RACE стратегии. Были идентифицированы две кДНК, названные HRT1 (1282 п.о., ORF 870 п.о.) и HRT2 (1051 п.о., ORF 852 п.о.). HRT1 и HRT2 кодируют белки, состоящие из 290 и 284 аминокислот (87.3% идентичности) с предсказанными молекулярными массами 33.2 и 32.8 кДа соответственно [30]. Анализ аминокислотных последовательностей показал, что HRT1 и HRT2 являются гидрофильными белками, содержащими на N-конце трансмембранные домены. Выведенные структуры демонстрируют высокий уровень идентичности (31.6, 32.0, 31.6, 29.9 и 30.1%) с цис-пренилтрансферазами из *M. luteus* B-P 26 [31], *S. cerevisiae* (Rer2p [32], Srt1p [33]), *E. coli* [34, 35] и *A. thaliana* [27, 36], соответственно. Более того, все 5 консервативных мотивов СРТ [29] присутствуют в структурах HRT1 и HRT2 (Supplementary Fig. S2).

Для анализа экспрессии генов HRT1 и HRT2 в различных тканях гевеи был использован Нозерн блот. Оба гена экспрессируются в основном в латексе, хотя низкий уровень экспрессии наблюдается также в листьях и проростках. Последовательности кДНК HRT1 и HRT2 высокомологичны, и, следовательно, нельзя исключить кросс-гибридизацию. Для более детального анализа тканеспецифичности экспрессии использовали RT-PCR. Праймеры соответствовали низкомологичным регионам HRT1 и HRT2 в кодирующих последовательностях и 3'-нетранслируемых регионах. Продукты амплификации наблюдались только в реакциях с использованием мРНК из латекса. Таким образом, HRT1 и HRT2, вероятно, функционируют в латексе, где также синтезируется натуральный каучук.

Для получения рекомбинантных HRT1 и HRT2 кДНК экспрессировали в *E. coli*, используя систему рЕТ32b(+), позволяющую получать белки в форме гибрида с тиоредоксином. После индукции с IPTG, клетки *E. coli* продуцировали значительные количества нерастворимых рекомбинантных белков размером около 52 кДа. Однако некоторое количество HRT2 было также обнаружено в растворимой фракции клеточного экстракта. Растворимая и нерастворимая фракции HRT2 были подвергнуты металл-аффинной хроматографии для выделения гибридных белков, содержащих полигистидин на С-конце, при нативных и денатурирующих условиях соответственно. Аффинная хроматография привела к получению высокоочищенного тиоредоксин-HRT гибрида. После расщепления гибрида энтерокиназой наблюдалось образование белка с молекулярной массой 33 кДа, соответствующей молекулярной массе HRT2.

СРТ активность в экстрактах *E. coli*, содержащих рекомбинантные HRT1 (BL21(DE3)/рETHRT1) и HRT2 (BL21(DE3)/рETHRT2) определяли, как описано в литературе [30]. Натуральный каучук экстрагировали смесью толуол/гексан (1 : 1) после удаления полиизопренов среднего размера 1-бутанолом. Если экстракт из клеток, оверэкспрессирующих HRT2, показывал небольшой уровень продукции натурального каучука, то в экстрактах клеток, оверэкспрессирующих HRT1, СРТ активности обнаружено не было. Так как СРТ активность в экстрактах *E. coli*, содержащих рекомбинантную HRT2, была незначительна, была проведена реакция полимеризации в присутствии промытых каучуковых частиц (WBP), которые являются местом инициации синтеза натурального каучука [30]. При коинкубации экстрактов, содержащих HRT1 и промытые каучуковые частицы (WBP), включение [<sup>14</sup>C]IPP в толуол/гексановую фракцию не отличалось от включения в контрольном эксперименте. Однако добавление WBP к гомогенату BL21(DE3)/рETHRT2 приводило к значительному увеличению включения [<sup>14</sup>C]IPP во фракцию, содержащую натуральный каучук. Таким образом, WBP содержат факторы, активирующие ферментативную активность HRT2. Интересно, что даже прогретые до 100°C течение 20 мин WBP способны частично активировать HRT2. Следовательно, некоторые активаторы HRT2 термостабильны.

СРТ активность также была обнаружена при использовании очищенной HRT2. Активность увеличивалась с ростом концентрации фермента до достижения насыщения. Эффект WBP на СРТ активность анализировали в присутствии 5 мкг HRT2. Активность увеличивалась пропорционально количеству добавленных WBP; насыщение наступало, когда количество WBP превышало 1 мг.

Для того чтобы определить молекулярную массу продуктов реакции HRT2 в присутствии WBP, был использован метод ГПХ. Основной продукт реакции имел молекулярную массу  $2 \times 10^5$ – $1 \times 10^6$  Да, что соответствует полиизопрену размером 3000–15000 изопреновых единиц. Наблюдались также небольшие количества продуктов с молекулярной массой  $3 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^3$  и  $1 \times 10^3$  Да (полимеры, содержащие 400, 30 и 15 единиц, соответственно). Когда реакция проводилась в отсутствие WBP, наблюдалось только небольшое количество полиизопренов с молекулярной массой от 2000 до  $10^4$  Да. Эти результаты показывают, что для синтеза натурального каучука HRT2 необходимы кофакторы, локализованные на поверхности WBP.

Для того чтобы определить, являются ли рекомбинантные HRT1 и HRT2 функционально активными СРТ *in vivo*, кДНК были экспрессированы в дрожжевом мутанте SNH23-7D, в котором отсутствует дегидродолицил-дифосфат синтаза. Этот штамм чувствителен к высокой температуре

и не может расти при 37°C. Интересно, что экспрессия HRT2 супрессирует мутантный фенотип, в то время как экспрессия HRT1 не влияет на фенотипические свойства мутанта.

HRT1, экспрессированная в *E. coli*, не обладает каучук-синтезирующей активностью. Вероятно, 35 аминокислотных замен между HRT1 и HRT2 являются критическими для ферментативных функций. Возможно, HRT1 принимает участие в синтезе полиизопренов, таких как дегидродолил-цил-дифосфат, или выполняет до сих пор неизвестную функцию в *H. brasiliensis* [30].

*Анализ кДНК цис-пренилтрансфераз, ответственных за биосинтез натурального каучука в Taraxacum kok-saghyz*

Только некоторые из около 2500 видов растений, содержащих натуральный каучук в латексе, производят достаточно большие количества высокомолекулярного полиизопрена, представляющие коммерческий интерес [3, 5]. К ним относится “Русский одуванчик” (*T. kok-saghyz*). Основным преимуществом рода *Taraxacum* является относительная простота генетических манипуляций, которая позволяет детально исследовать механизм биосинтеза натурального каучука *in planta* [5].

Для клонирования ключевых ферментов биосинтеза натурального каучука, СРТ *T. kok-saghyz*, были синтезированы вырожденные праймеры, соответствующие консервативным участкам последовательностей *H. brasiliensis* HRT1 and HRT2 [30], *A. thaliana* ACPT [27] и *Saccharomyces cerevisiae* Rer 2 [32]. RT-PCR, проведенный с использованием тотальной РНК из латекса в качестве матрицы, привел к идентификации трех неполных кДНК, кодирующих различные СРТ. При помощи метода RACE были клонированы 5'- и 3'-концы; полноразмерные последовательности были обозначены как TkCPT1, TkCPT2 и TkCPT3. Анализ нуклеотидных последовательностей показал присутствие ORF размером 927 п.о. (TkCPT1 и TkCPT2) и 906 п.о. (TkCPT3), которые потенциально кодируют белки с молекулярной массой 35 кДа (TkCPT1 и TkCPT2) и 34.2 кДа (TkCPT3), соответственно. Аминокислотные последовательности TkCPT1, TkCPT2 и TkCPT3 обладают высоким уровнем идентичности (98%) [29]. Они также гомологичны, хотя и в меньшей степени, HRT1 (53%), HRT2 (52%), Rer2 (21%) и ACPT (21%) (Supplementary Fig. S2). Все 5 консервативных мотивов, которые отличают СРТ от транс-пренилтрансфераз (ТРТ), были идентифицированы в TkCPT1, TkCPT2 и TkCPT3 [24]. Некоторые из них выполняют критические функции. Так, мотив I необходим для узнавания и связывания FPP [37]. Мотив III контролирует геометрию связывания IPP и также необходим для каталитической активности [37]. Мотивы III и V участвуют в элон-

гации полиизопреновых цепей [25]. Интересно, что консервативные аминокислотные остатки в СРТ, необходимые для синтеза коротких полиизопреновых цепей [25, 38], отсутствуют в TkCPT1, TkCPT2 и TkCPT3. Эти наблюдения, а также высокая степень консервативности аминокислотных последовательностей между тремя СРТ из *T. kok-saghyz* и двумя из *H. brasiliensis*, позволяют предположить, что TkCPT1, TkCPT2 и TkCPT3 принимают участие в синтезе натурального каучука в клетках *T. kok-saghyz*.

Как было отмечено, натуральный каучук синтезируется в специализированных клетках латекса – латициферах. Исходя из этого, была исследована тканеспецифичность экспрессии TkCPT1-3, для того чтобы понять, соответствует ли она предполагаемой роли ферментов в биосинтезе натурального каучука. Тканеспецифичность экспрессии СРТ1-3 в четырех тканях (корни, листья, стебли и цветки) исследовали методом RT-PCR. Было установлено, что среди трех СРТ *T. kok-saghyz* только TkCPT1 преимущественно экспрессируется в латексе. TkCPT2 и TkCPT3 показывают примерно одинаковый уровень мРНК в латексе и корнях. Следует отметить, что низкий уровень мРНК наблюдается в корнях и стеблях в случае TkCPT1 и в стеблях в случае TkCPT2 и TkCPT3, соответственно (Supplementary Fig. S3). Анализ энзимологически активных WBP, выделенных из корней *T. kok-saghyz*, показал, что все три TkCPT экспрессируются преимущественно в латициферах и ассоциированы с WBP [39]. Интересно, что эти ферменты способны синтезировать высокомолекулярный полиизопрен в дрожжах [39].

*Внутриклеточная концентрация цис-пренилтрансфераз регулирует биосинтез натурального каучука в Taraxacum brevicorniculatum*

К настоящему времени идентифицировано относительно небольшое число СРТ подсемейства RT, включая два фермента из гевеи (HRT1 и HRT2). Интересно, что HRT2 (но не HRT1) способна синтезировать высокомолекулярный натуральный каучук в присутствии WBP из латекса гевеи, APР и дивалентных катионов, таких как Mg<sup>2+</sup> и Mn<sup>2+</sup>, играющих роль кофакторов [30]. Однако до недавнего времени, не было прямого подтверждения участия СРТ в биосинтезе натурального каучука *in planta*.

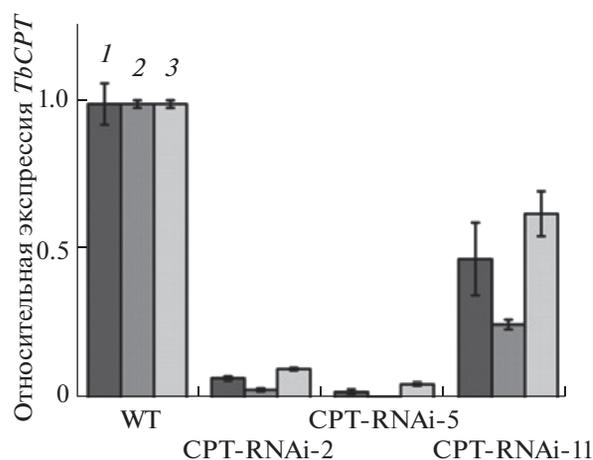
Для более полного понимания роли СРТ1-3 в латексе были созданы трансгенные растения *Taraxacum brevicorniculatum*, близкого родственника *Taraxacum kok-saghyz*, в которых экспрессия всех трех генов СРТ была подавлена с использованием метода РНК-интерференции (RNAi) [40]. Трансформация *T. brevicorniculatum* бактериями *Agrobacte-*

*rium tumefaciens*, несущими соответствующие бинарные плазмиды, привела к изоляции 12 независимых трансгенных линий. Присутствие трансгенов было подтверждено ПЦР. Уровни экспрессии каждого гена *TbCPT* в латексе из корней анализировали методом RT-PCR, используя праймеры, специфические для *TbCPT1-3*. Так как эффективность супрессии синтеза мРНК варьировала от линии к линии, были выбраны три линии для дальнейшего анализа. Линии *CPT-RNAi-2* и *CPT-RNAi-5* демонстрировали практически полную супрессию, в случае линии *CPT-RNAi-11* супрессия была лишь частичной (рис. 2). Трансгенные растения были морфологически неотличимы от растений дикого типа. Во всех трех линиях наивысший остаточный уровень экспрессии наблюдался в случае *TbCPT3*, далее следовали *TbCPT1* и *TbCPT2* [40].

На белковом уровне эффективность нокаутов *TbCPT1-3* определяли с помощью вестерн-блота латексных белков. Были использованы поликлональные антитела, узнающие все три *TbCPT*. В контрольном растении дикого типа анализ показал присутствие белков с молекулярными массами 34 кДа (*TbCPT1* и 2) и 32 кДа (*TbCPT3*), соответственно. Если в линии *CPT-RNAi-11* уровень *TbCPT* был только частично понижен по сравнению с растениями дикого типа, то в линиях *CPT-RNAi-2* и *CPT-RNAi-5* белки не детектировались вестерн-блотом (не показано).

Для понимания взаимосвязи между количеством *TbCPT* ферментов в латексе и суммарной пренилтрансферазной активностью, было исследовано включение [ $^{14}\text{C}$ ]IPP в экстракты латекса из каждой трансгенной линии и контрольного растения. Короткие и средние полиизопреновые цепи были экстрагированы бутанолом [30], затем длинноцепочечные продукты были экстрагированы смесью толуола и гексана. Активность СРТ, приводящая к образованию длиннорастворимых цепей, была обнаружена после добавления в реакцию экстрактов из клеток дикого типа (0.62 пмоль/(мин мг)) и *CPT-RNAi-11* (0.5 пмоль (мин мг)). При использовании экстрактов из линий *CPT-RNAi-2*, *CPT-RNAi-5* соответствующая активность отсутствовала [40].

Для определения молекулярной массы продуктов, синтезируемых в экстрактах из растений дикого типа и линии *CPT-RNAi-11*, была использована эксклюзионная хроматография (EX). Эти исследования показали, что в растениях дикого типа синтезируется высокомолекулярный полиизопрен с молекулярной массой между  $10^5$  и  $10^7$  Да. В растениях линии *CPT-RNAi-11* наблюдался более низкий уровень полиизопрена с молекулярной массой около  $10^7$  Да. Гексановые экстракты из линий *CPT-RNAi-2*, *CPT-RNAi-5* не содержали высокомолекулярный полиизопрен, что со-



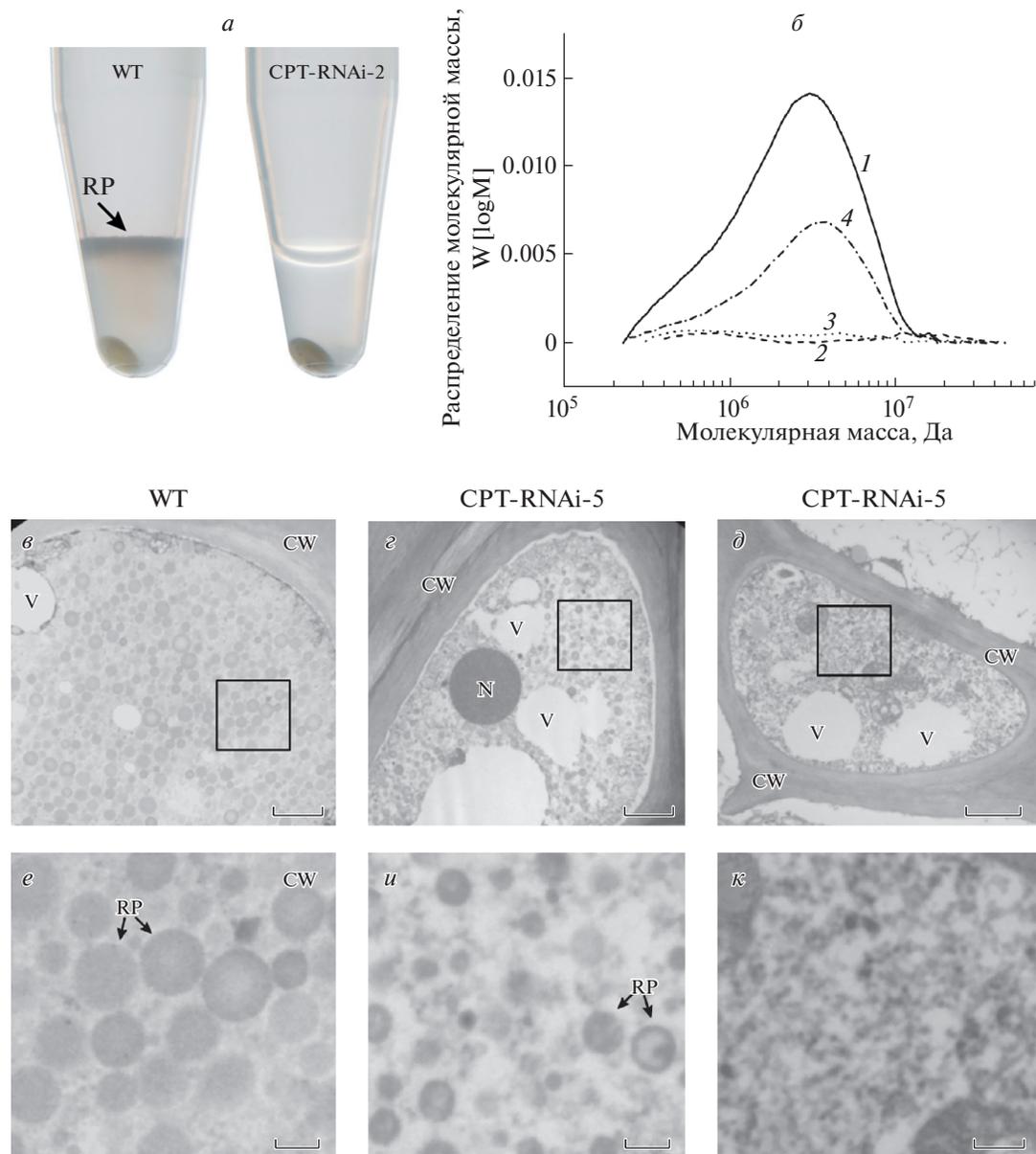
**Рис. 2.** Сайленсинг РНК *TbCPT1-3* в трансгенных *CPT-RNAi* линиях *T. brevicorniculatum*. Количественный RT-PCR анализ экспрессии *TbCPT1-3* в латексе из корней трансгенных *CPT-RNAi* линий и растения дикого типа (WT). Уровни экспрессии были нормализованы относительно уровня *TbGAPDH* и значение 1 было установлено для WT. 1 – *TbCPT1*; 2 – *TbCPT2*; 3 – *TbCPT3*. Рисунок взят из статьи Post с соавт. [40].

гласуется с отсутствием активности СРТ в экстрактах из этих линий [40].

Интересные результаты были получены при анализе латекса из растений дикого типа и трансгенных линий. При центрифугировании экстракта латекса из растений дикого типа наблюдалось образование осадка, растворимой фракции цитоплазмы (C-segum) и верхней каучуковой фракции, содержащей каучуковые частицы. В латексе трансгенных растений *CPT-RNAi-2* и *CPT-RNAi-5* каучуковая фракция отсутствовала (рис. 3). Эти данные убедительно демонстрируют ключевую роль *TbCPT1-3* в биосинтезе натурального каучука *in planta*.

Количество высокомолекулярного полиизопрена в экстрактах из корней растений дикого типа и трансгенных линий было также исследовано с использованием  $^1\text{H}$ -ЯМР спектроскопии. Интенсивный сигнал, соответствующий цис-1,4-полиизопрену, наблюдался при анализе экстрактов из корней дикого типа. Экстракты из трансгенов *CPT-RNAi-2* и *CPT-RNAi-5* показывали гораздо более слабые сигналы. При сравнительном анализе интенсивности пика соответствующему протону при атоме углерода C5 было установлено, что количество цис-1,4-полиизопрена в экстрактах из корней линий *CPT-RNAi-2*, *CPT-RNAi-5* и *CPT-RNAi-11* составляло 25, 38 и 84% по сравнению с экстрактом из корней дикого типа [40].

Гравиметрический анализ показал, что корни линий *CPT-RNAi-2* и *CPT-RNAi-5* содержат незначительное количество высокомолекулярного полиизопрена. Лиофилизированные корни были



**Рис. 3.** Влияние сайленсинга CPT на содержание натурального каучука и его состав. Экстракты латекса после центрифугирования (а). Верхняя фаза, содержащая каучуковые частицы (RP), отсутствовала в латексе из трансгенных линий CPT-RNAi-2 и CPT-RNAi-5 (CPT-RNAi-2 показана в качестве примера). ЕХ-хроматография (б) экстрактов латекса из клеток дикого типа (WT) и трансгенных CPT-RNAi линий. 1 – WT; 2 – CPT-RNAi-2; 3 – CPT-RNAi-5; 4 – CPT-RNAi-11. Экстракты латекса были обработаны гексаном для выделения гидрофобных веществ. Молекулярная масса была определена с использованием стандартов полиизопрена. Изображения латиферов, полученные с помощью TEM, из клеток растения дикого типа (WT, в) и трансгенной линии CPT-RNAi-5 (г, д). Изображения в нижнем ряду (е–к) показывают детали в квадратах при более высоком увеличении. CW – клеточная стенка; N – ядро; RP – каучуковые частицы; V – вакуоль. Шкала рисунка соответствует 1 мкм (в–д) и 0,2 мкм (е–к). Рисунок взят из статьи Post с соавт. [40].

обработаны толуолом для экстракции полиизопрена, который затем осаждали метанолом и центрифугировали. Масса осадков, полученных из линий CPT-RNAi-2 и CPT-RNAi-5, составляла 7 и 4% по сравнению с осадком из растений дикого типа, соответственно. Таким образом, результаты ЯМР-спектроскопии и гравиметрического анализа однозначно показывают, что уровень синтеза натурального

каучука значительно снижен в трансгенных линиях CPT-RNAi-2 и CPT-RNAi-5.

Размер поли-цис-1,4-изопреновых цепей, синтезируемых *in planta*, был исследован методом ЕХ-латексных экстрактов. Экстракты из растений дикого типа содержали большое количество полиизопрена с молекулярной массой  $10^6$ – $10^7$  Да. В полном соответствии с результатами ЯМР спек-

троскопии и гравиметрического анализа, количество полиизопрена было понижено в экстрактах из линии CPT-RNAi-11, однако молекулярная масса полимера не отличалась от молекулярной массы полиизопрена из растений дикого типа. Таким образом, уровень активности CPT не влияет на размер полиизопреновых цепей. Как и ожидалось, высокомолекулярные полиизопреновые цепи отсутствовали в экстрактах из линий CPT-RNAi-2 и CPT-RNAi-5 (рис. 3).

Примечательно, что отсутствие высокомолекулярного полиизопрена в трансгенных линиях CPT-RNAi-2 и CPT-RNAi-5 совпадает с дефектной морфологией каучуковых частиц в латексе, что объясняет отсутствие каучуковой фракции в центрифугатах этих линий. Морфологию каучуковых частиц внутри латифиферов из корней каждой линии изучали методом электронной трансмиссионной микроскопии (ТЕМ). Латифиферы растений дикого типа были плотно заполнены каучуковыми частицами. В отличие от растений дикого типа, клетки трансгенных линий CPT-RNAi-2 и CPT-RNAi-5 содержали всего несколько меньших по размеру каучуковых частиц. В некоторых латифиферах каучуковые частицы полностью отсутствовали (рис. 3). Вероятно, каучуковые частицы из трансгенных растений обладают свойствами, отличными от свойств частиц из растений дикого типа, так как они не способны формировать каучуковую фазу в процессе центрифугирования [40].

Как указывалось выше, несмотря на множество исследований *in vitro*, ключевая роль CPT в биосинтезе природного каучука не была показана непосредственно *in planta*. Таким образом, ингибирование экспрессии TбCPT1-3 методом RNAi и его влияние на биосинтез природного каучука убедительно продемонстрировали роль TбCPT1-3 в этом процессе в клетках растений. *T. brevicorniculatum* представляет собой идеальную модель для подобных исследований, потому что это растение производит высококачественный натуральный каучук, имеет короткий жизненный цикл и может быть генетически модифицировано с использованием относительно простых и надежных подходов.

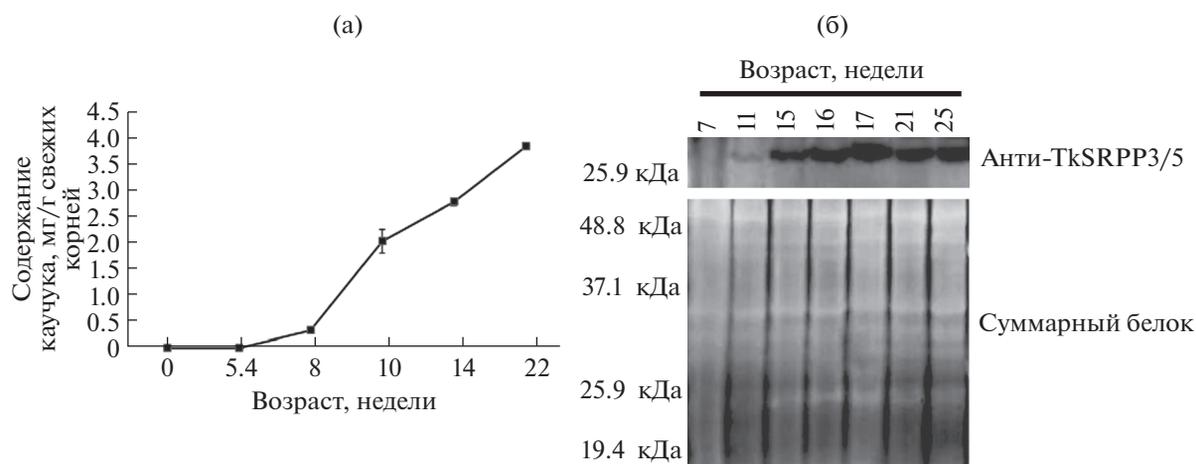
#### РОЛЬ МАЛЫХ БЕЛКОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С КАУЧУКОВЫМИ ЧАСТИЦАМИ, В БИОСИНТЕЗЕ НАТУРАЛЬНОГО КАУЧУКА

Таким образом, анализ данных, имеющихся в нашем распоряжении к настоящему времени, не вызывает сомнений в том, что CPT играют ключевую роль в биосинтезе натурального каучука *in planta*. К сожалению, мембранная ассоциация CPT затрудняет изучение этих ферментов и функционально связанных с ними белков при использовании классических биохимических подходов. Однако несколько белков-кандидатов были

идентифицированы либо на основе их ассоциации с каучуковыми частицами [41], либо исходя из пространственного и временного паттерна их экспрессии [42–44]. Один из таких белков, малый белок, ассоциированный с каучуковыми частицами (SRPP), обнаруженный в латексе *H. brasiliensis*, является кислым белком (pI 4.8) с молекулярной массой 23 кДа [45]. Были также идентифицированы гомологи SRPP в *P. argentatum* [46] и *T. kok-saghyz* [29]. Несколько наблюдений указывают на важную роль SRPP в биосинтезе натурального каучука. Во-первых, в гевее SRPP экспрессируется во фракции латекса, синтезирующей натуральный каучук [29, 45]. Во-вторых, SRPP локализован на поверхности каучуковых частиц [28, 47]. В-третьих, *in vitro* исследования показали, что добавление рекомбинантного SRPP к каучуковым частицам из гевеи или гваюлы приводит к значительному увеличению полимеразной активности CPT [45, 46]. В-четвертых, инкубация каучуковых частиц с антителами против SRPP приводит к значительному снижению активности CPT [45].

В то же время, несмотря на убедительные результаты исследований *in vitro*, указывающие на участие SRPP в биосинтезе натурального каучука, *in planta* данные полностью отсутствовали. Для тестирования гипотезы, предполагающей, что уровень экспрессии SRPP коррелирует с качеством и количеством природного каучука, производимого в растениях, были использованы подходы обратной генетики. Для этих исследований растения *T. kok-saghyz*, легко трансформируемые агробактериями, послужили модельной системой для анализа генов, потенциально важных для биосинтеза натурального каучука. Основным преимуществом *T. kok-saghyz* перед гевеей и гваюлой, которые также могут быть трансформированы агробактериями, является то, что изменение уровня продукции каучука в трансформантах можно анализировать в течение первых 9 месяцев жизни растения, тогда как гевея и гваюла требуют 5 и 2 года, соответственно (время, необходимое для достижения приемлемого уровня продукции натурального каучука).

Сравнительный анализ EST-последовательностей *T. kok-saghyz*, используя известную последовательность SRPP из гевеи, привел к идентификации пяти кДНК, кодирующих потенциальные SRPP [29]. Исследования протеома *T. kok-saghyz* показали, что три из них, а именно TkSRPP3, TkSRPP4 и TkSRPP5, ассоциированы с каучуковыми частицами [48]. Эти белки мигрируют в виде кластера на 2D-гель электрофорезе. Идентичность каждого SRPP с высокой степенью вероятности была подтверждена масс-спектрометрическим анализом. Для TkSRPP3 было подтверждено около 80% последовательности и 40% — для TkSRPP4 и TkSRPP5. TkSRPP3, являющийся основной изоформой,



**Рис. 4.** Содержание натурального каучука и TksRPP белков в развивающихся корнях *T. kok-saghyz*. Накопление натурального каучука (а). Каучук был экстрагирован из растений в возрасте от 5 до 22 недель. Стандартная девиация была рассчитана на основании как минимум трех независимых экспериментов. Накопление TksRPP3/5 (б) в течение развития *T. kok-saghyz*. На верхней панели показаны результаты вестерн-блота с использованием очищенных анти-TksRPP3 антител. Нижняя панель демонстрирует количество нанесенного белка, окрашенного Сипро рубиновым. Рисунок взят из статьи Collins-Silva с соавт. [48].

связанной с каучуковыми частицами, был изучен более детально.

Вначале было исследовано, наблюдается ли корреляция между уровнями TksRPP3/5 белков (поликлональные антитела одинаково эффективно узнают TksRPP3 и TksRPP5, но очень слабо реагируют с TksRPP4) и TksRPP3 транскрипта и накоплением натурального каучука в корневых тканях растения. Каучук не детектируется в 4-недельных растениях. Его накопление начинается в 5.4 недели, причем наибольшая скорость наблюдается между 8 и 10 неделями. После этой стадии развития корней уровень каучука продолжает расти, но более медленно. Вестерн-блот-анализ показал, что паттерн накопления TksRPP3/5 коррелирует с паттерном накопления каучука в процессе развития корней. Белки отсутствуют в очень молодых корнях и впервые детектируются в растениях возрастом около 11 недель, что совпадает с периодом наиболее быстрого накопления натурального каучука. Значительный рост уровня TksRPP3/5 белков наблюдается между 11 и 15 неделями, после чего уровень остается неизменным (рис. 4). Уровень TksRPP3 транскрипта достигает максимального значения к 7 неделе и затем постепенно падает. Таким образом, экспрессия TksRPP3 коррелирует с накоплением природного каучука в корнях [48]. Как показали недавние исследования, в латексе *H. brasiliensis* содержится множество изоформ SRPP, однако экспрессия только нескольких из них коррелирует с продукцией натурального каучука при стимуляции биосинтеза этиленом [24].

Для того чтобы функционально охарактеризовать роль SRPP в биосинтезе натурального каучука, TksRPP3 был сверхэкспрессирован в трансгенном

*T. kok-saghyz*. С помощью агробактерии *A. tumefaciens* в геном растения была введена конструкция, содержащая TksRPP3 кДНК под контролем промотора CaMV 35S. Анализ RT-PCR в реальном времени показал, что две из пяти трансгенных линий, названных OE1 и OE2, имеют повышенный уровень (> 2 раз) транскрипта TksRPP3. Вестерн-блот-анализ также показал повышенный уровень TksRPP3/5 белков в сверхэкспрессирующих трансгенных линиях. Измерение содержания природного каучука в этих линиях продемонстрировало, что концентрация полимера в линии OE2 повышена по сравнению с векторным контролем (1.88 и 1.43 мг/г, соответственно). В случае линии OE1 эффект был меньше, но все же значительным (1.67 и 1.43 мг/г). Молекулярная масса природного каучука в сверхэкспрессирующих линиях практически не отличалась от массы каучука в контрольной линии и варьировала в пределах  $1-1.2 \times 10^6$  Да [48]. Фенотипически трансгенные растения не отличались от растений дикого типа.

Для более детального изучения роли SRPP в биосинтезе природного каучука экспрессия гена TksRPP3 в *T. kok-saghyz* была подавлена с помощью RNAi-подхода. Было получено 8 трансгенных линий, в двух из которых, получивших название RNAi1 и RNAi2, уровень TksRPP3 мРНК был значительно ниже, чем в контрольной векторной линии. Вестерн-блот-анализ показал, что в этих линиях уровень белков TksRPP3/5 также понижен. Обе линии продуцировали существенно меньше натурального каучука по сравнению с контрольной линией. Если корни RNAi1 и RNAi2 содержали 1.08 и 0.79 мг/г каучука, соответственно, то содержание каучука в контрольной линии до-

стигало 1.48 мг/г [48]. Более того, молекулярная масса каучука в трансгенных линиях была значительно ниже, чем в контрольной линии. Когда экспрессия гена TkSRPP3 была подавлена RNAi, молекулярная масса понижалась до  $\sim 0.3 \times 10^6$  Да (RNAi1) и до  $0.5 \times 10^6$  Да (RNAi2). В контрольной линии средняя молекулярная масса природного каучука составляла  $\sim 0.9 \times 10^6$  Да [48]. Как и в случае оверэкспрессии, фенотипически трансгенные линии не отличались от контрольной. Таким образом, подавление экспрессии TkSRPP3 в *T. kok-saghyz* оказывает существенное влияние на количество синтезируемого природного каучука и его молекулярную массу.

### АКТИВАТОР ЦИС-ПРЕНИЛТРАНСФЕРАЗЫ КАК КЛЮЧЕВОЙ РЕГУЛЯТОРНЫЙ БЕЛОК В БИОСИНТЕЗЕ НАТУРАЛЬНОГО КАУЧУКА

Семейство СРТ включает в себя не только ферменты, ответственные за биосинтез натурального каучука, но и другие СРТ, способные синтезировать полиизопреновые цепи с максимальной длиной до 50 изопреновых единиц [24, 25]. В эукариотах эти ферменты синтезируют долихол, необходимый для гликозилирования белков, и другие полиизопреноиды, выполняющие различные функции, включая адаптацию к стрессу [49, 50]. СРТ человека, ответственная за биосинтез долихола, содержащего 22 изопреновых единицы, взаимодействует с Nogo-B рецепторным белком (NgBR). Этот белок стабилизирует фермент посредством прямых белок-белковых взаимодействий и также необходим для ферментативной активности СРТ [51, 52]. С-конец NgBR гомологичен СРТ, но другие домены, характерные для этих ферментов (мотивы I–V) отсутствуют, вследствие чего рецептор не обладает каталитической активностью [51, 53].

Было исследовано, могут ли белки, родственные NgBR, также стабилизировать СРТ, ответственные за биосинтез натурального каучука, в качестве компонентов трансферазного комплекса на поверхности каучуковых частиц. Следует отметить, что NgBR – интегральный белок эндоплазматического ретикулаума (ЭПР), и, следовательно, обнаружение его растительного аналога подтвердило бы гипотезу, согласно которой каучуковые частицы являются производными ЭПР [51, 52, 54].

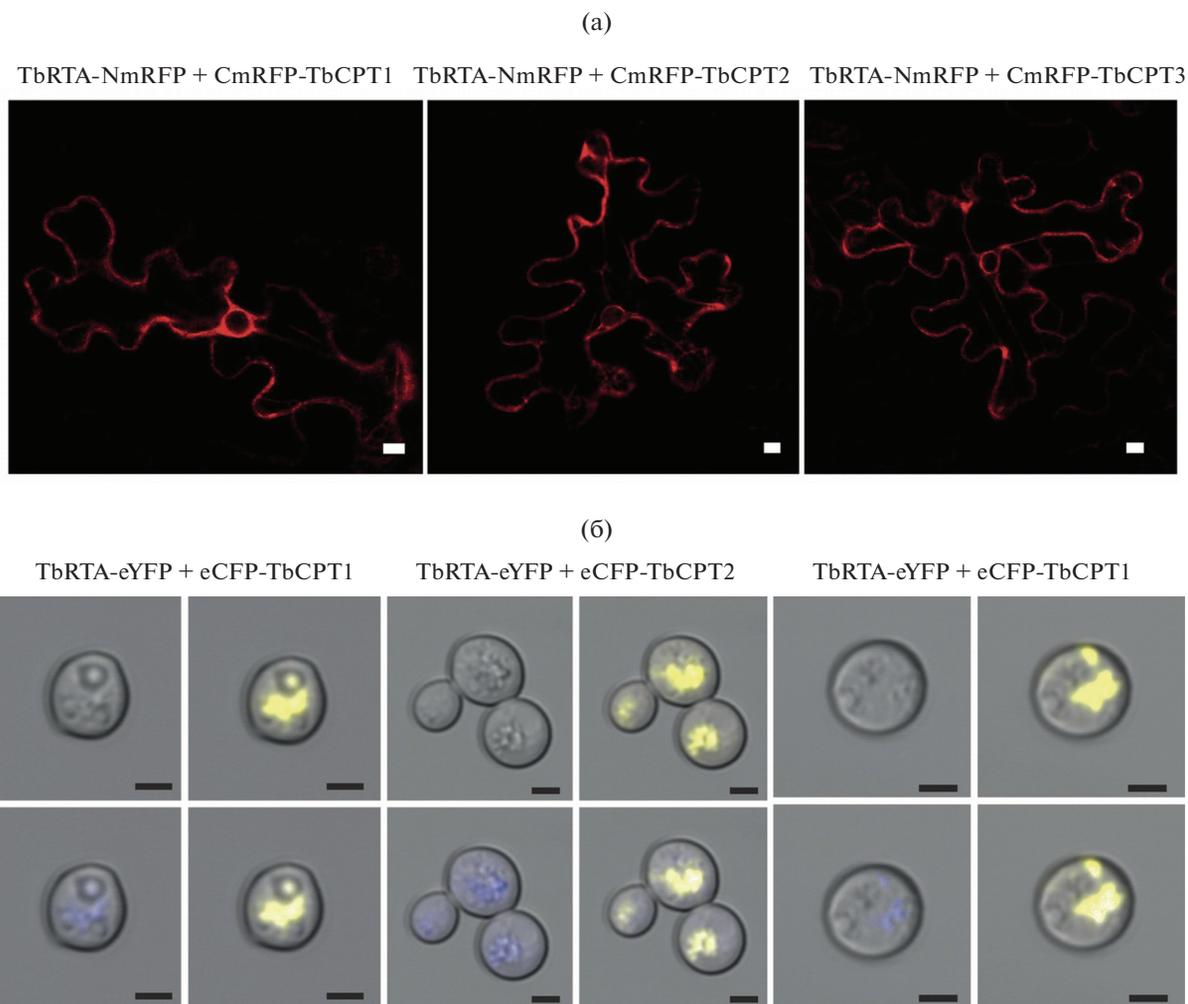
Как было упомянуто выше, в клетках *T. kok-saghyz* были обнаружены три СРТ (TkCPT1–3), ассоциированные с каучуковыми частицами и необходимыми для биосинтеза натурального каучука [29, 39]. Однако эти ферменты не имеют трансмембранных доменов, и поэтому механизм их локализации на мембране каучуковых частиц оставался неясным.

Для дальнейшего анализа белков, ассоциированных с каучуковыми частицами, очищенные частицы из *T. brevicorniculatum* были обработаны трипсином и полученные пептиды были анализированы масс-спектрометрией. Определенные последовательности использовали для скрининга базы данных NCBI. Было установлено, что четыре пептида соответствуют EST DR00807 кДНК из корней *T. kok-saghyz*. Более того, BLAST-анализ показал, что эта EST гомологична NgBR-рецептору. Исходя из того, что NgBR физически взаимодействует с СРТ, было предположено, что гомолог NgBR из каучуковых частиц *T. brevicorniculatum* взаимодействует с ферментами, синтезирующими каучук и, тем самым, является до сих пор неидентифицированным компонентом трансферазного комплекса на поверхности этих органелл [55].

Полноразмерная кДНК, соответствующая *T. kok-saghyz* EST, была амплифицирована на основе мРНК из латекса *T. brevicorniculatum*. ORF кодирует белок, состоящий из 244 аминокислотных остатков и имеющий молекулярную массу 28.6 кДа. Он на 24–25% идентичен человеческому и мышинному NgBR и на 42–48% – растительным NgBR из *Medicago truncatula* (Mt NgBR), *Oryza sativa* (Os NgBR) и *A. thaliana* (AtLEW1). Белок содержит три консервативных региона (мотивы I, II и III), характерные для NgBR растений и млекопитающих. Исходя из предполагаемой функциональной аналогии с NgBR, этот белок получил название активатор цис-пренилтрансферазы (TbRTA) [55]. Недавние исследования привели к идентификации гомологов RTA, известного также как белок-связывающий цис-пренилтрансферазы (CPT-binding protein, CPB) в нескольких растениях [56], включая салат (*Lactuca sativa*) [57], томаты (*Lycopersicon esculentum*) [58] и гваюлу (*Parthenium argentatum*) [59].

RT-PCR анализ показал, что концентрация мРНК, кодирующей TbRTA, в латексе гораздо выше, чем в других тканях. Это коррелирует с экспрессией СРТ1–3 и предполагает, что TbRTA принимает участие в биосинтезе каучука. Было сконструировано трансгенное растение *T. brevicorniculatum*, экспрессирующее TbRTA, содержащий эпитоп с-Мус. Латекс из этого растения был разделен на три фазы: осадок, интерфаза и фаза, содержащая каучуковые частицы. Последующий иммуноблот показал, что белок массой 33 кДа, с-Мус-TbRTA, локализован исключительно во фракции, содержащей каучуковые частицы и, скорее всего, ассоциирован с ними.

Интересные результаты были получены при исследовании локализации TbRTA в клетках *Nicotiana benthamiana*. Ген С-концевого гибридного белка, состоящего из TbRTA и голубого флуоресцентного белка Cerulean (TbRTA-Cerulean), был транзientно экспрессирован в клетках табака и

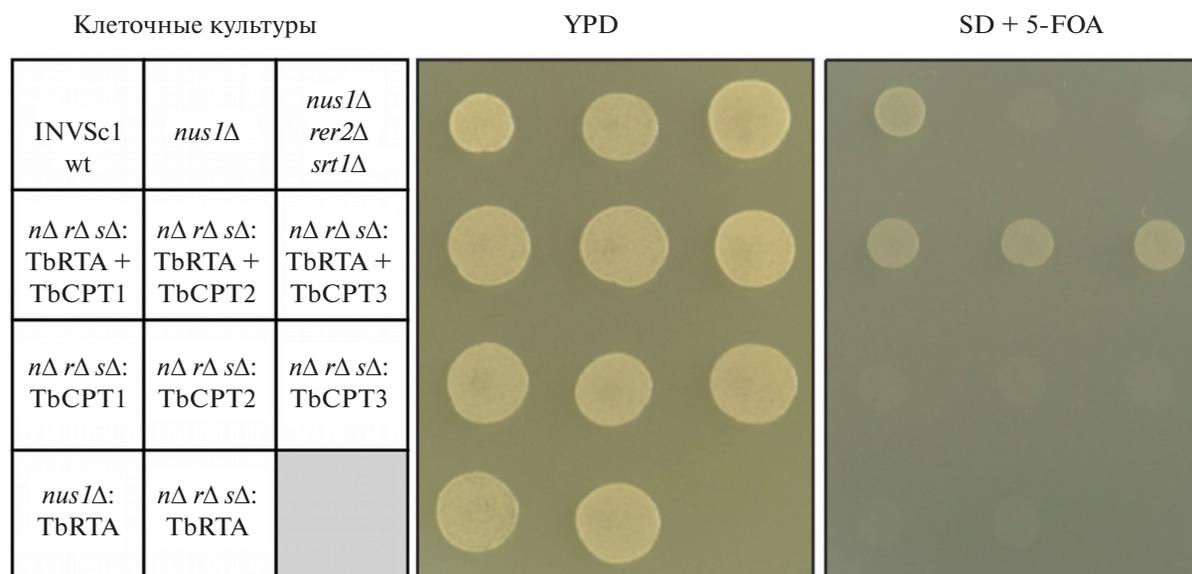


**Рис. 5.** TbRTA взаимодействует с TbCPT1-3. ViFC анализ клеток *N. benthamiana*, коэкспрессирующих TbRTA-NmRFP и CmRFP-CPT1-3 (a). Шкала рисунка соответствует 10 мкм. FRET анализ дрожжевых клеток, коэкспрессирующих TbRTA-eYFP и eCFP-TbCPT1-3 (б). CLSM изображения соответствующих клеток. Показаны изображения, полученные по методу Номарского, eYFP и eCFP флуоресценция и оверлеи. Шкала рисунка соответствует 2 мкм. Рисунок взят из статьи Erping с соавт. [55].

его локализация была исследована методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (CLSM). Мономерный красный флуоресцентный белок mRFP был использован в качестве цитозольного контроля, а гибридный белок, состоящий из N-концевой последовательности стерол-14-деметилазы (NtermCYP51G1) и mRFP – в качестве контроля эндоплазматического ретикулума (ЭПР) (NtermCYP51G1 локализован на цитоплазматической стороне ЭПР мембраны). CLSM анализ показал, что гибридный белок TbRTA-Sergulean колокализован с NtermCYP51G1-mRFP, а не с цитозольным контролем mRFP (Supplementary Fig. S4). Таким образом, было продемонстрировано, что TbRTA локализован на ЭПР мембране в клетках *N. benthamiana*. Это соответствует свойствам NgBR и подтверждает модель, согласно которой биогенез каучуковых частиц происходит на ЭПР мембране [53, 55].

В клетках млекопитающих NgBR физически взаимодействует с CPT, ответственной за синтез долихола [53]. Для того чтобы определить, взаимодействует ли растительный гомолог NgBR (TbRTA) с CPT1-3 в клетках *T. brevicorniculatum*, были использованы несколько подходов.

В бимолекулярном флуоресцентном комплементационном анализе (ViFC) использовались части mRFP. Комбинации TbRTA и CPT1-3 в виде C- и N-концевых гибридных белков с фрагментами RFP были экспрессированы в клетках *N. benthamiana*. Физическое взаимодействие между TbRTA и TbCPT1-3 предполагалось воссоздание полноразмерного RFP и, следовательно, флуоресценцию. Действительно, интенсивная флуоресценция наблюдалась, когда TbRTA, слитый с N-концевым фрагментом mRFP (TbRTA-NmRFP) был коэкспрессирован с каждой CPT, слитой с C-концевым



**Рис. 6.** Функциональная комплементация СРТ активности в дрожжах *Sacharomyces cerevisiae*. Мутантные штаммы *nus1Δ rer2Δ srt1Δ* (*nΔ rΔ sΔ*) и *nus1Δ* были трансформированы комбинацией TbRTA и TbCPT1-1 плазмид или TbRTA и TbCPT1-1 плазмидами и контрольным вектором. Клетки выращивали на богатой YPD среде или на полной минеральной среде, содержащей 1 г/л 5-фтороротовой кислоты (SD + 5-FOA). Рисунок взят из статьи Erping с соавт. [55].

фрагментом mRFP (CmRFP-TbCPT1-3) (рис. 5). Инвертированная комбинация приводила к тем же результатам. Для подтверждения специфичности BiFC системы TbRTA-NmRFP был коэкспрессирован с NtermCYP51G1-CmRFP. Как и ожидалось, в этом случае флуоресценции не наблюдалось. Клетки, коэкспрессирующие свободные компоненты mRFP или их комбинацию с TbRTA или TbCPT1-3, слитыми с соответствующими частями mRFP, служили дополнительным отрицательным контролем [55].

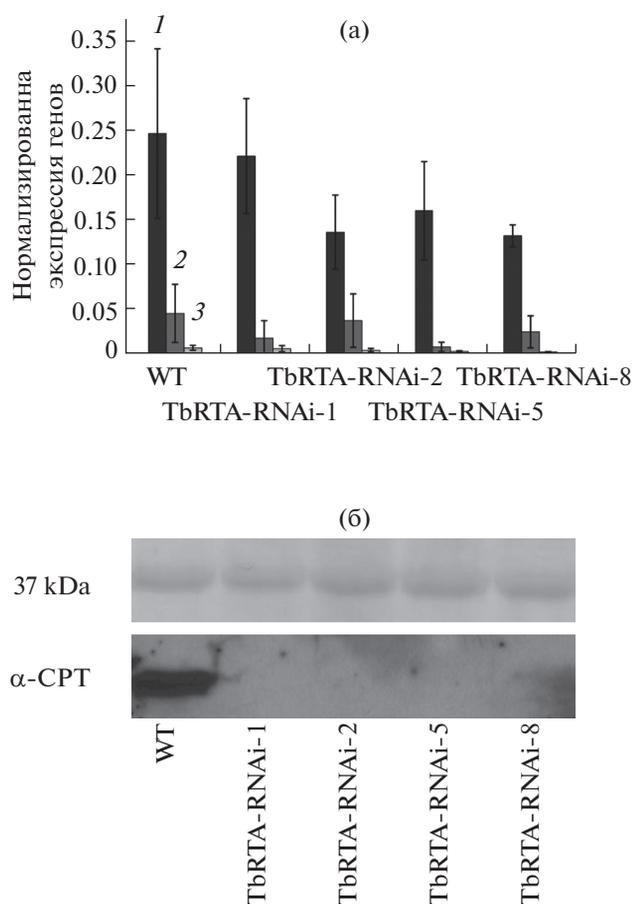
Эти результаты были подтверждены коиммунопреципитацией. НА (хемоагглютинин)-TbRTA и с-Мус-TbCPT1-3 были транзитивно коэкспрессированы в клетках *N. benthamiana*. Взаимодействие было подтверждено коэлюцией и детекцией с использованием анти-НА и анти-с-Мус антител. В контрольном растении, экспрессирующем только TbRTA, сигнала в элюируемой фракции не наблюдалось. Таким образом, BiFC и коиммунопреципитация подтверждают взаимодействие TbRTA и TbCPT1-3 *in planta* [55].

Был также проведен анализ флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET). Были созданы несколько гибридных белков, в которых С-конец TbRTA был слит с желтым флуоресцентным белком eYFP (TbRTA-eYFP), и С-конец голубого флуоресцентного белка был слит с TbCPT1-3 (eCFP-TbCPT1-3). При коэкспрессии этих конструкций в дрожжах взаимодействие между TbRTA и TbCPT1-3 должно вызывать FRET между eCFP и eYFP, т.е. возбуждение eCFP должно приводить к эмиссии eYFP. Действительно, дрожжевые клет-

ки, коэкспрессирующие TbRTA-eYFP и любой из eCFP-TbCPT, показывали интенсивную желтую флуоресценцию [55] (рис. 5). В контрольных клетках, экспрессирующих TbRTA-eYFP и eCFP или eYFP и eCFP FRET, эффект не наблюдался.

Комплементационный анализ в дрожжах показал, что TbRTA необходим для ферментативной активности TbCPT1-3. TbRTA и TbCPT1-3 поодиночке или в комбинации были экспрессированы в тройном мутанте *nus1Δ rer2Δ srt1Δ*. Эти клетки могут расти на богатой среде YPD, только если они содержат плазмиду, экспрессирующую *Giardia lamblia* cis-PTase [60], ген которой локализован на *URA3* плазмиде. На среде, содержащей 5-фтороротовую кислоту (5-FOA), экспрессия *Ura3* превращает 5-FOA в токсическое производное 5-фторурацил. Таким образом, только клетки, потерявшие *URA3* плазмиду, и в которых *nus1Δ rer2Δ srt1Δ* мутации комплементированы комбинацией TbRTA/TbCPT1-3, могут расти на средах, содержащих 5-FOA. Действительно, анализ показал, что только TbRTA вместе с TbCPT1-3 могут комплементировать тройной мутант. TbRTA и TbCPT1-3 по отдельности не способны поддерживать рост дрожжевых клеток на средах, содержащих 5-FOA [55] (рис. 6).

Для изучения роли TbRTA в биосинтезе натурального каучука экспрессия гена TbRTA в клетках *T. brevicorniculatum* была подавлена с использованием RTA-RNAi подхода. Среди полученных восьми трансгенных линий семь показывали выраженный ингибиторный эффект, четыре из которых (1, 2, 5 и 8) были выбраны для дальнейшего анализа. При-



**Рис. 7.** Влияние нокаута TbRTA на экспрессию TbCPT. Анализ экспрессии TbCPT1-3 в латексе с помощью RT-PCR (а). 1 – TbCPT1; 2 – TbCPT2; 3 – TbCPT3. Стандартная девиация была рассчитана на основании трех независимых экспериментов. Анализ экспрессии TbCPT1-3 белков вестерн-блоттингом (б). Верхняя панель показывает белки, окрашенные понсо S после переноса на нитроцеллюлозную мембрану. Рисунок взят из статьи Erping с соавт. [55].

мечательно, что подавление экспрессии TbRTA не влияло на рост и развитие трансгенов. Они были неотличимы от контрольных растений дикого типа.

В первую очередь, было исследовано влияние подавления экспрессии TbRTA на синтез натурального каучука. Латекс, собранный из растений дикого типа, после центрифугирования образовывал пенообразный верхний слой, содержащий каучуковые частицы. В латексе трансгенных растений верхний слой отсутствовал. Более того, они не содержали нормальных каучуковых частиц, вместо этого в латифиферах трансгенов было обнаружено некоторое количество пустых структур, по форме напоминающих нормальные частицы. Отсутствие каучука в трансгенных линиях было подтверждено <sup>1</sup>H-ЯМР анализом, который показал, что TbRTA-RNAi линии 1, 2, 5 и 8 содержат только 1.7–2.7 мг/г полиизопрена в латексе и

0.09–0.19 мг/г полиизопрена в корнях. Для сравнения, растения дикого типа содержали 108 мг/г и 2.19 мг/г полиизопрена в латексе и корнях, соответственно [55].

Были также проведены RT-PCR, в реальном времени, и вестерн-блот-анализы для того, чтобы выяснить, является ли ингибирование TbCPT1-3 экспрессии причиной отсутствия натурального каучука в трансгенах, или это посттрансляционная потеря соответствующих белков. Было показано, что уровни TbCPT1-3 мРНК примерно одинаковы в трансгенных RNAi линиях и контрольном растении дикого типа. Интересно, что вестерн-блот-анализ показал отсутствие TbCPT1-3 белков во всех четырех трансгенных линиях (рис. 7). Эти результаты предполагают, что TbRTA необходим для поддержания активной конформации TbCPT1-3 в составе трансферазного комплекса на мембране каучуковых частиц и объясняют отсутствие полиизопрена в TbRTA-RNAi трансгенных линиях. Таким образом, TbRTA не только активирует TbCPT1-3, но и предохраняет трансферазы от деградации. Более того, принимая во внимание тот факт, что TbCPT1-3 не имеют трансмембранного домена, TbRTA может играть важную роль в локализации трансфераз на поверхности каучуковых частиц [55].

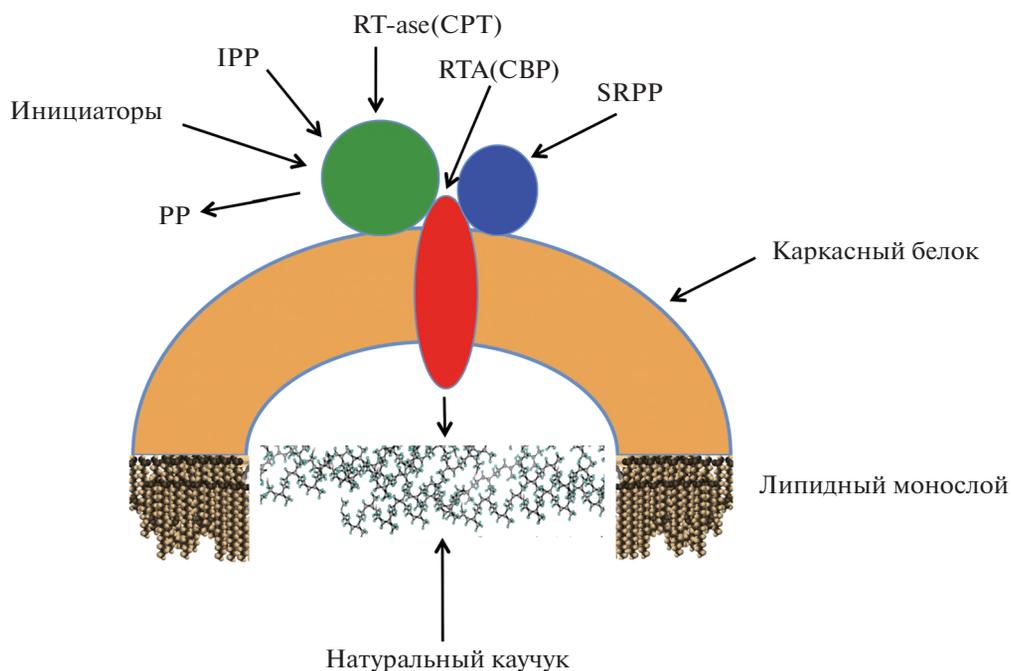
Для того чтобы исключить возможность того, что подавление экспрессии TbRTA влияет на экспрессию генов других белков трансферазного комплекса, был измерен уровень TbSRPP в трансгенных линиях. Он существенно не отличался от уровня этих белков в растениях дикого типа [55].

Таким образом, TbRTA является ключевым компонентом трансферазного комплекса. К сожалению, в настоящее время не представляется возможным синтезировать натуральный каучук на основе гетерологичной микробной или растительной платформ. Однако идентификация новых компонентов трансферазного комплекса может привести к решению этой проблемы в будущем.

Следует также отметить, что на основании данных, описанных выше, была предложена модель функционирования трансферазного комплекса на мембране каучуковых частиц, представленная на рис. 8.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как было отмечено выше, более чем 2500 видов растений способны синтезировать натуральный каучук. К сожалению, большинство из них обладает нежелательными характеристиками, такими как очень низкий выход и недостаточная молекулярная масса полимера. В настоящее время *H. brasiliensis* является единственным растением, производящим коммерчески значимый природный каучук [5], однако из-за специфических условий



**Рис. 8.** Схематическая модель цис-пренилтрансферазного комплекса, встроенного в мембрану каучуковой частицы. Комплекс состоит из каркасного белка и белков, ответственных за биосинтез натурального каучука — RT-ase (CPT), RTA (CBP) и SRPP. Данная модель предложена на основании анализа последних литературных данных.

роста, высокой чувствительности к патогенам и трудоемкости сбора продукта поиск других потенциальных продуцентов вызывает большой интерес. *P. argentatum* и *T. kok-saghyz* являются потенциальными альтернативными источниками натурального каучука. Они не столь требовательны к природным условиям (растут в более холодных и менее плодородных географических регионах), имеют короткое время созревания и могут быть посеяны и собраны с использованием промышленных подходов. Каучук из их экстрактов имеет примерно одинаковую молекулярную массу с каучуком из *H. brasiliensis*, однако содержит гораздо меньше аллергенных белков [5, 6, 20]. В 2015 году первая автомобильная шина из каучука *P. argentatum* была произведена Bridgestone Corporation. Это направление, безусловно, имеет высокий потенциал для развития.

Несмотря на существенный прогресс в поиске и разработке альтернативных источников натурального каучука, эффективность потенциальных продуцентов остается серьезным препятствием. Прогресс, достигнутый в агробактериальной генетической трансформации каучуконосов, должен привести к увеличению выхода натурального каучука. Также относительно простой геном и короткий жизненный цикл *T. kok-saghyz* делает его идеальной модельной системой для изучения биосинтеза натурального каучука.

В течение последних 20 лет были охарактеризованы множество аспектов биосинтеза натурального

каучука, таких как обнаружение и характеристика CPT, механизм полимеризации изопрена и измерение молекулярной массы полимера [4, 56]. В этом обзоре мы кратко описываем прогресс в изучении молекулярно-генетических аспектов биосинтеза натурального каучука, достигнутый в последнее время.

Авторы благодарны к.б.н. В.В. Мартиросян за критические замечания и помощь в написании данного обзора.

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. Eng A.H., Ong E.L. Hevea natural rubber // *Plastics engineering: handbook of elastomers* / Eds. Bhowmick A.K., Stephens H. New York: Marcel Dekker, 2000, P. 29.
2. McIntyre D., Stephens H.L., Schloman Jr. W.W., Bhowmick A.K. Guayule rubber // *Plastics engineering: handbook of elastomers* / Eds. Bhowmick A.K., Stephens H. New York: Marcel Dekker, 2000, P. 1.
3. Puskas J.E. Producers and world market of synthetic rubbers // *Biopolymers, polyisoprenoids* / Eds. Koyama E., Steinbuechel A. Weinheim: Wiley, 2001, P. 287.
4. Cornish K. Rubber production // *Encyclopedia of Applied Plant Sciences, Second edition* / Eds. Thomas B., Murphy D.J., Murray B.G. Cambridge: Academic

- Press, 2016, P. 410.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00088-5>
5. Cornish K. Alternative natural rubber crops: why should we care? // *Technol. Innov.* 2017. V. 18. P. 245.  
<https://doi.org/10.21300/18.4.2017.245>
  6. Cornish K., Xie W., Kostyal D., Shintani D., Hamilton R.G. Immunological analysis of the alternate natural rubber crop *Taraxacum kok-saghyz* indicates multiple proteins cross-reactive with *Hevea brasiliensis* latex allergens // *J. Biotechn. Biomat.* 2015. V. 5. P. 201.  
<https://doi.org/10.4172/2155-952X.1000207>
  7. Arias M., Herrero J., Ricobaraza M., Hernández M., Ritter E. Evaluation of root biomass, rubber and inulin contents in nine *Taraxacum koksaghyz* Rodin populations // *Ind. Crops Prod.* 2016. V. 83. P. 316.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.01.023>
  8. Kreuzberger M., Hahn T., Zibek S., Schiemann J., Thiele K. Seasonal pattern of biomass and rubber and inulin of wild Russian dandelion (*Taraxacum koksaghyz* L. Rodin) under experimental field conditions // *Eur. J. Agro.* 2016. V. 80. P. 66.  
<https://doi.org/10.1016/j.eja.2016.06.011>
  9. Luo Z., Iafaldano B.J., Zhuang X., Fresnedo-Ramírez J., Cornish K. Analysis of the first *Taraxacum kok-saghyz* transcriptome reveals potential rubber yield related SNPs // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 9939.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-09034-2>
  10. Ramirez-Cadavid D.A., Cornish K., Michel F.C. Jr. *Taraxacum kok-saghyz* (TK): compositional analysis of a feedstock for natural rubber and other bioproducts // *Ind. Crops Prod.* 2017. V. 107. P. 624.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.043>
  11. Eranki P.L., El-Shikha D., Hunsaker D.J., Bronson K.F., Landis A.E. A comparative life cycle assessment of flood and drip irrigation for guayule rubber production using experimental field data // *Ind. Crops Prod.* 2017. V. 99. P. 97.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.01.020>
  12. Soratana K., Rasutis D., Azarabadi H., Eranki P.L., Landis A.E. Guayule as an alternative source of natural rubber: A comparative life cycle assessment with Hevea and synthetic rubber // *J. Cleaner Prod.* 2017. V. 159. P. 271.  
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.05.070>
  13. Cornish K. Hypoallergenic natural rubber products from *Parthenium argentatum* (gray) and other non-*Hevea brasiliensis* species. US Patent 5,580,942, 1996; 5,717,050. 1998.
  14. Men X., Wang F., Chen G.-Q., Zhang H.B., Xian M. Biosynthesis of natural rubber: current state and perspectives // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. 50.  
<https://doi.org/10.3390/ijms20010050>
  15. Cherian S., Beungtae Ryu S.-B., Cornish K. Natural rubber biosynthesis in plants, the rubber transferase complex, and metabolic engineering progress and prospects // *Plant Biotech. J.* 2019. V. 17. P. 204.  
<https://doi.org/10.1111/pbi.13181>
  16. Amerik A.Yu., Martirosyan Yu.Tc., Gachok I.V. Regulation of natural rubber biosynthesis by proteins associated with rubber particles // *Rus. J. Bioorg. Chem.* 2018. V. 44. P. 140.  
<https://doi.org/10.1134/S106816201801003X>
  17. Akhtar T.A., Matsuba Y., Schauvinhold I., Yu G., Lees H.A., Klein S.E., Pichersky E. The tomato cis prenyltransferase gene family // *Plant J.* 2013. V. 73. P. 640.  
<https://doi.org/10.1111/tpj.12063>
  18. Yamashita S., Yamaguchi H., Waki T., Aoki Y., Mizuno M., Yanbe F., Ishii T., Funaki A., Tozawa Y., Miyagi-Inoue Y., Fushihara K., Nakayama T., Takahashi S. Identification and reconstitution of the rubber biosynthetic machinery on rubber particles from *Hevea brasiliensis* // *eLife*, 2016. V. 5. e19022.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.19022>
  19. Grabińska K.A., Park E.J., Sessa W.C. cis-Prenyltransferase: New Insights into Protein Glycosylation, Rubber Synthesis, and Human Diseases // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291. P. 18582.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.R116.739490>
  20. Cornish K. Similarities and differences in rubber biochemistry among plant species // *Phytochemistry*. 2001. V. 57. P. 1123.  
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00097-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00097-8)
  21. Cornish K. Biochemistry of natural rubber, a vital raw material, emphasizing biosynthetic rate, molecular weight and compartmentalization, in evolutionarily divergent plant species // *Nat. Prod. Rep.* 2001. V. 18. P. 182. <https://doi.org/1039/a902191d>
  22. da Costa B.M.T., Keasling J.D., Cornish K. Regulation of rubber biosynthetic rate and molecular weight in *Hevea brasiliensis* by metal cofactor // *Biomacromolecules*. 2005. V. 6. P. 279.  
<https://doi.org/10.1021/bm049606w>
  23. da Costa B.M.T., Keasling J.D., McMahan C.M., Cornish K. Magnesium ion regulation of *in vitro* rubber biosynthesis by *Parthenium argentatum* Gray // *Phytochemistry*. 2006. V. 67. P. 1621.  
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.04.010>
  24. Kharel Y., Koyama T. Molecular analysis of cis-prenyl chain elongating enzymes // *Nat. Prod. Rep.* 2003. V. 20. P. 111.  
<https://doi.org/10.1039/b108934j>
  25. Kharel Y., Takahashi S., Yamashita S., Koyama T. Manipulation of prenyl chain length determination mechanism of cis-prenyltransferases // *FEBS J.* 2006. V. 273. P. 647.  
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.05097.x>
  26. Surmacz L., Plochocka D., Kania M., Danikiewicz W., Swiezewska E. cis-Prenyltransferase *atCPT6* produces a family of very short-chain polyisoprenoids in *planta* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1841. P. 240.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.11.011>
  27. Oh S.K., Hwan Han K., Ryu S.B., Kang H. Molecular cloning, expression, and functional analysis of a cis-prenyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. Implications in rubber biosynthesis // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 18482.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M002000200>
  28. d'Auzac J., Jacob J.L., Chrestin H. The composition of latex from *Hevea brasiliensis* as a laticiferous cytoplasm // *Physiology of Rubber Tree Latex* / Eds. d'Auzac J., Jacob J.L., Chrestin H. Boca Raton: CRC Press. 1989. P. 59.  
<https://doi.org/10.1201/9781351075695>

29. Schmidt T., Hillebrand A., Wurbs D., Wahler D., Lenders M., Gronover C.H., Pruffer D. Molecular cloning and characterization of rubber biosynthetic genes from *Taraxacum koksaghyz* // Plant Mol. Biol. Rep. 2010. V. 28. P. 277.  
<https://doi.org/10.1007/s11105-009-0145-9>
30. Asawatreratanakul K., Zhang Y.-W., Wititsuwannakul D., Wititsuwannakul R., Takahashi S., Rattanapittayaporn A., Koyama T. Molecular cloning, expression and characterization of cDNA encoding cis-prenyltransferases from *Hevea brasiliensis*. A key factor participating in natural rubber biosynthesis // Eur. J. Biochem. 2003. V. 270. P. 4671.  
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03863.x>
31. Shimizu N., Koyama T., Ogura K. Molecular cloning, expression, and purification of undecaprenyl diphosphate synthase. No sequence similarity between E- and Z-prenyl diphosphate synthases // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 19476.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.31.19476>
32. Sato M., Sato K., Nishimura S., Hirata A., Kato J., Nakano A. The yeast *RER2* gene, identified by endoplasmic reticulum protein localization mutations, encodes cis-prenyltransferase, a key enzyme in dolichol synthesis // Mol. Cell. Biol. 1999. V. 19. P. 471.  
<https://doi.org/10.1128/mcb.19.1.471>
33. Sato M., Fujisaki S., Sato K., Nishimura Y., Nakano A. Yeast *Saccharomyces cerevisiae* has two cis-prenyltransferases with different properties and localizations. Implication for their distinct physiological roles in dolichol synthesis // Genes Cells. 2001. V. 6. P. 495.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2001.00438.x>
34. Apfel C.M., Takacs B., Fountoulakis M., Stieger M., Kreck W. Use of genomics to identify bacterial undecaprenyl pyrophosphate synthetase: cloning, expression, and characterization of the essential *uppS* gene // J. Bacteriol. 1999. V. 181. P. 483.
35. Kato J., Fujisaki S., Nakajima K., Nishimura Y., Sato M., Nakano A. The *Escherichia coli* homologue of yeast *RER2*, a key enzyme of dolichol synthesis, is essential for carrier lipid formation in bacterial cell wall synthesis // J. Bacteriol. 1999. V. 181. P. 2733.
36. Cunillera N., Arro M., Fores O., Manzano D., Ferrer A. Characterization of dehydrodolichyl diphosphate synthase of *Arabidopsis thaliana*, a key enzyme in dolichol biosynthesis // FEBS Lett. 2000. V. 477. P. 170.  
[https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01798-1](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01798-1)
37. Fujihashi M., Zhang Y.-W., Higushi Y., Li X.-Y., Koyama T., Miki K. Crystal structure of cis-prenyl chain elongating enzyme, undecaprenyl diphosphate synthase // PNAS. 2001. V. 98. P. 4337.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.071514398>
38. Ambo T., Noike M., Kurokawa H., Koyama T. Cloning and functional analysis of novel short-chain cis-prenyltransferases // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008. V. 375. P. 536.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.08.057>
39. Schmidt T., Lenders M., Hillebrand A., van Deenen N., Munt O., Reichelt R., Eisenreich W., Fischer R., Prüfer D., Gronover C.S. Characterization of rubber particles and rubber chain elongation in *Taraxacum koksaghyz* // BMC Biochem. 2010. V. 11.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2091-11-11>
40. Post J., van Deenen N., Fricke J., Kowalski N., Wurbs D., Schaller H., Eisenreich W., Huber C., Twyman R.M., Prüfer D., Gronover C.S. Laticifer-specific cis-prenyltransferase silencing affects the rubber, triterpene, and inulin content of *Taraxacum brevicorniculatum* // Plant Physiology. 2012. V. 15. P. 1406.  
<https://doi.org/10.1104/pp.111.187880>
41. Dennis M.S., Light D.R. Rubber elongation factor from *Hevea brasiliensis*. Identification, characterization, and role in rubber biosynthesis // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 18608.
42. Kush A., Goyvaerts E., Chye M.L., Chua N.H. Laticifer-specific gene expression in *Hevea brasiliensis* (rubber tree) // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1990. V. 87. P. 1787.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.87.5.1787>
43. Han K.H., Shin D.H., Yang J., Kim I.J., Oh S.K., Chow K.S. Genes expressed in the latex of *Hevea brasiliensis* // Tree Physiol. 2000. V. 20. P. 503.  
<https://doi.org/10.1093/treephys/20.8.503>
44. Chow K.S., Wan K.L., Isa M.N., Bahari A.A., Tan S.-H., Harikrishna K., Yeang H.-Y. Insights into rubber biosynthesis from transcriptome analysis of *Hevea brasiliensis* latex // J. Exp. Bot. 2007. V. 58. P. 2429.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erm093>
45. Oh S.K., Kang H., Shin D.H., Yang J., Chow K.S., Yeang H.Y., Wagner B., Breiteneder H., Han K.H. Isolation, characterization, and functional analysis of a novel cDNA encoding a small rubber particle protein from *Hevea brasiliensis* // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 17132.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.17132>
46. Kim I.J., Ryu S.B., Kwak Y.S., Kang H. A novel cDNA from *Parthenium argentatum* Gray enhances the rubber biosynthetic activity *in vitro* // J. Exp. Bot. 2004. V. 55. P. 377.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erh039>
47. Yeang H.Y., Ward M.A., Zamri A.S., Dennis M.S., Light D.R. Amino acid sequence similarity of Hev b 3 to two previously reported 27- and 23-kDa latex proteins allergenic to spina bifida patients // Allergy. 1998. V. 53. P. 513.  
<https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1998.tb04089.x>
48. Collins-Silva J., Nural A.T., Skaggs A., Scott D., Hathwaik U., Woolsey R., Schegg K., McMahan C., Whalen M., Cornish K., Shintani D. Altered levels of the *Taraxacum kok-saghyz* (Russian dandelion) small rubber particle protein, TkSRPP3, result in qualitative and quantitative changes in rubber metabolism // Phytochemistry. 2012. V. 79. P. 46.  
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.04.015>
49. Kera K., Takahashi S., Sutoh T., Koyama T., Nakayama T. Identification and characterization of a cis,trans-mixed heptaprenyl diphosphate synthase from *Arabidopsis thaliana* // FEBS J. 2012. V. 279. P. 3813.  
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08742.x>
50. Surmacz L., Plochocka D., Kania M., Danikiewicz W., Swiezewska E. cis-Prenyltransferase atCPT6 produces a family of very short-chain polyisoprenoids in planta // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1841. P. 240.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.11.011>
51. Harrison K.D., Park E.J., Gao N., Kuo A., Rush J.S., Waechter C.J., Lehrman M.A., Sessa W.C. Nogo-B re-

- ceptor is necessary for cellular dolichol biosynthesis and protein N-glycosylation // *EMBO J.* 2011. V. 30. P. 2490.  
<https://doi.org/10.1038/emboj.2011.147>
52. *Park E.J., Grabińska K.A., Guan Z., Stránecký V., Hartmannová H., Hodaňová K., Barešová V., Sovová J., Jozsef L., Ondrušková N., Hansíková H., Honzík T., Zeman J., Hůlková H., Wen R. et al.* Mutation of Nogo-B receptor, a subunit of cis-prenyltransferase, causes a congenital disorder of glycosylation // *Cell Metab.* 2014. V. 20. P. 448.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.06.016>
53. *Miao R.Q., Gao Y., Harrison K.D., Prendergast J., Acevedo L.M., Yu J., Hu F., Strittmatter S.M., Sessa W.C.* Identification of a receptor necessary for Nogo-B stimulated chemotaxis and morphogenesis of endothelial cells // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 2006. V. 103. P. 10997.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0602427103>
54. *Martin S., Parton R.G.* Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle // *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. V. 7. P. 373.  
<https://doi.org/10.1038/nrm1912>
55. *Epping J., van Deenen N., Niephaus E., Stolze A., Fricke J., Huber C., Eisenreich W., Twyman R.M., Prüfer D., Gronover C.S.* A rubber transferase activator is necessary for natural rubber biosynthesis in dandelion // *Nature Plants.* 2015. V. 1. Article 15048. P. 1.
56. *Kwon M., Kwon J.G., Ro D.K.* cis-Prenyltransferase and polymer analysis from a natural rubber perspective // *Methods Enzymol.* 2016. V. 576. P. 121.  
<https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.02.026>
57. *Qu Y., Chakrabarty R., Tran H.T., Kwon E.J., Kwon M., Nguyen T.D., Ro D.K.* A lettuce (*Lactuca sativa*) homolog of human Nogo-B receptor interacts with cis-prenyltransferase and is necessary for natural rubber biosynthesis // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. P. 1898.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.616920>
58. *Brasher M.I., Surmacz L., Leong B., Pitcher J., Swieżewska E., Pichersky E., Akhtar T.A.* A two-component enzyme complex is required for dolichol biosynthesis in tomato // *Plant J.* 2015. V. 82. P. 903.  
<https://doi.org/10.1111/tpj.12859>
59. *Lakusta A.M., Kwon M., Kwon E.G., Stonebloom S., Scheller H.V., Ro D.K.* Molecular studies of the protein complexes involving cis-prenyl transferase in guayule (*Parthenium argentatum*), an alternative rubber-producing plant // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. P. 165.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00165>
60. *Grabińska K.A., Cui J., Chatterjee A., Guan Z., Raetz C.R., Robbins P.W., Samuelson J.* Molecular characterization of the cis-prenyltransferase of *Giardia lamblia* // *Glycobiology.* 2010. V. 20. P. 824.  
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwq036>

УДК 581.1

## РАЗЛИЧИЯ В ПРОЯВЛЕНИИ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ КЛЕТОК *in vivo* И *in vitro* У МУТАНТА *Arabidopsis thaliana* С ФЕНОТИПОМ НАРУШЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ПАМЯТИ

© 2021 г. Е. В. Куприянова<sup>а, \*</sup>, Е. Р. Денисова<sup>а</sup>, М. А. Байер<sup>а</sup>, Т. А. Ежова<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования  
“Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова”, Москва, Россия

\*e-mail: [ekupriyanova@gmail.com](mailto:ekupriyanova@gmail.com)

Поступила в редакцию 30.04.20 г.

После доработки 16.06.2020 г.

Принята к публикации 17.06.2020 г.

Культивируемые *in vitro* клетки растений — удобная модель для изучения генетических и физиологических механизмов, необходимых для приобретения клетками состояния плюрипотентности. Благодаря исследованиям на модельном растении *Arabidopsis thaliana* ранее была установлена ключевая роль генов, поддерживающих плюрипотентность клеток апикальной меристемы побега, в регенерации побегов *de novo* в культуре ткани. В соответствии с этим, клетки мутантных растений с более высоким уровнем экспрессии генов плюрипотентности характеризовались повышенным потенциалом регенерации побегов *de novo*. Мутант *tae* оказался исключением из этого правила. На поздних стадиях развития листа у мутанта возобновлялись экспрессия генов плюрипотентности и пролиферация клеток, что указывает на нарушение механизмов поддержания эпигенетической клеточной памяти. В то же время культивируемые клетки листа *in vitro* демонстрировали более низкую пролиферативную активность по сравнению с диким типом и не были способны к регенерации побегов *de novo*. Снижение регенерационного потенциала культивируемых клеток мутанта *tae* указывает на важную роль эпигенетической памяти в ответе клеток на экзогенные гормоны. Нарушение эпигенетической памяти клеток листа мутанта *tae* и различия в их пролиферативной и регенерационной способности в условиях *in planta* и *in vitro* делают этот мутант уникальной моделью для изучения роли эпигенетических модификаций в регуляции плюрипотентности клеток.

**Ключевые слова:** морфогенез листа, плюрипотентность клеток, культура клеток, эпигенетика, *Arabidopsis thaliana*

DOI: 10.31857/S0015330321010103

### ВВЕДЕНИЕ

Растения характеризуются высокой пластичностью развития, способностью к перепрограммированию клеток и приобретению ими свойства плюрипотентности. Эти особенности позволяют растениям образовывать новые меристемы в ходе морфогенеза, а при повреждениях — формировать каллусы на месте поранения, обеспечивая непрерывность развития. В связи с этим изучение генетической и физиологической регуляции плюрипотентности растительных клеток — актуальное в последнее десятилетие направление биологии развития растений. Удобной моделью для изучения степени детерминированности соматических клеток и тканей из разных органов, выявления ключевых факторов, необходимых для каллусогенеза и регенерации побегов, являются культивируемые клетки растений. В условиях *in vitro* клетки эксплантов способны к дедифференцировке и приобретению плюрипотентного состояния, ко-

торое может приводить к образованию побеговых и корневых меристем и соматических эмбриондов, что отражает основные стратегии регенерации растений *in vivo* [1].

Ключевые факторы каллусогенеза и регенерации — содержание фитогормонов (экзогенных в питательной среде и эндогенных в клетках экспланта), а также генетически обусловленный уровень чувствительности клеток к фитогормонам. Не менее важным фактором для инициации каллусогенеза *in vitro* и *in vivo* являются стрессовые воздействия — поранения, активные формы кислорода, биотические и абиотические стрессовые воздействия. Поранения приводят к нарушениям межклеточных взаимодействий, которые играют ключевую роль в определении клеточной идентичности у растений, и также вызывают изменения гормонального гомеостаза, влияя на синтез гормонов и гормональные сигнальные пути [2–4].

Установлена роль активных форм кислорода и генов, контролируемых их метаболизм, в регуляции процессов регенерации [5, 6]. Выявлены общие генетические компоненты и активное взаимодействие генных сетей, вовлеченные в ответ на поранения, окислительный стресс и воздействие экзогенных гормонов, что объясняет сходные конечные эффекты их воздействия [7, 8]. Главным итогом воздействия гормонов, поранений и окислительного стресса является дедифференцировка клеток, которая обусловлена активацией нескольких групп генов, поддерживающих недетерминированность клеток меристем [4, 5].

К основным генам, поддерживающим недетерминированное состояние клеток апикальной меристемы побега (генам плюрипотентности, или стволовости), относятся ген *WUS* и гены *KNOX*-семейства класса I – *KN1/BP*, *KN2*, *KN6*, *STM* [9, 10]. Установлено, что цитокинины активируют экспрессию гена *WUS* и *KNOX*-генов, продукты которых, в свою очередь, активируют экспрессию генов синтеза цитокинина [11–13]. Экспрессия гена *WUS* также приводит к подавлению транскрипции негативных регуляторов цитокининового сигнального пути [14] и снижению уровня ауксинового сигнала в центральной зоне апикальной меристемы побега, предохраняя клетки от дифференцировки [15]. На экспрессию гена *WUS* влияет содержание активных форм кислорода: перекись водорода снижает, а супероксид-анион повышает уровень экспрессии *WUS* [5], хотя механизмы этого влияния пока не исследованы.

Способность фитогормонов активировать экспрессию генов плюрипотентности и механизмы обратной регуляции генов синтеза гормонов и генов сигнальных гормональных путей являются неотъемлемой частью поддержания меристем при развитии растений. Активация генов плюрипотентности при стрессовых воздействиях (в первую очередь, при поранениях) – основа механизмов репарации повреждений у растений. Влияние фитогормонов и стрессовых воздействий на экспрессию генов плюрипотентности объясняет и способность экзогенных гормонов в культуре *in vitro* индуцировать перепрограммирование клеток эксплантов и вызывать органогенез *de novo*. При нарушении функции генов плюрипотентности (например, при мутациях *stm*, *wus*) способность к регенерации побегов *in vitro* снижается или полностью отсутствует [16, 17]. И наоборот, при гиперэкспрессии генов плюрипотентности наблюдается усиление регенерационной способности *in vitro* [18].

Гиперэкспрессия генов плюрипотентности (у трансгенных растений или у растений с мутациями в негативных регуляторах экспрессии генов плюрипотентности) вызывает также нарушения морфогенеза листа. Клетки листа таких растений

сохраняют плюрипотентность, что приводит к развитию на листьях эктопических выростов и почек. Например, выросты образуются у одиночных мутантов *as1* [19, 20], *as2* [21, 22] и двойных мутантов *bop1 bop2*. Во всех случаях в листьях мутантов наблюдалась эктопическая экспрессия генов плюрипотентности [19–21]. У растений *Arabidopsis thaliana* дикого типа, также как и у других видов растений с простым листом, гены плюрипотентности прекращают экспрессию в клетках листа на ранних стадиях его формирования. Это замолкание поддерживается эпигенетическими механизмами на всех последующих стадиях развития листа, что необходимо для развития простого нерассеченного листа [23].

Ранее нами описан мутант, у которого наблюдали эктопические деления клеток листа [24], развитие вторичного края листа и формирование почек на верхней стороне листа [25]. Эти процессы наблюдались только на поздних стадиях развития листа, что указывает на репрограммирование генома и приобретение плюрипотентности клетками листа.

Цель работы – изучение экспрессии генов плюрипотентности и эпигенетических регуляторов в листьях мутанта и дикого типа *Arabidopsis thaliana* разного возраста и оценка способности к каллусогенезу и регенерации листовых эксплантов *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали линию мутанта *Arabidopsis thaliana tae* из коллекции кафедры генетики МГУ, прошедшую семь возвратных скрещиваний на родительскую расу Blanes-M (дикий тип, ДТ). Растения выращивали в условиях длинного дня в ростовой комнате при трех температурных режимах: 26–28°C, 22–24°C, 18–20°C. Для визуализации делений клеток листа использовали ранее полученную линию мутанта, содержащую трансген *CycB1;1:GUS* в гомозиготном состоянии. Об активации промотора гена циклина *CycB1;1* в трансгенной конструкции *CycB1;1:GUS* судили по экспрессии репортерного гена *uidA* β-глюкуронидазы (GUS), как указано ранее [24]. Число выростов и почек учитывали на развитых листьях растений, перешедших к цветению.

Для каллусогенеза использовали среду, содержащую соли МС-среды, витамины Гамборга (B5), 2% сахарозы, 0.8% агары, а также гормоны – 0.2 мг/л БАП и 1 мг/л НУК. Для индукции регенерации побегов 4-недельные каллусы пересаживали на среду того же состава, но с иным содержанием гормонов – 1 мг/л БАП, 0.05 мг/л НУК. Каллусные культуры и исходные растения (источники эксплантов) выращивали либо при 22–24°C, либо при 18–20°C. Экспланты получали из листьев

растений на начальных этапах роста цветоносов. Эксперименты проводили в двух повторностях. Высаживали по 44–50 экплантов каждого генотипа. Эффективность каллусогенеза оценивали как отношение число каллусов/число экплантов после 4 недель культивирования в %.

РНК выделяли из листьев растений разного возраста, выращенных при температуре 22–24°C. РНК из каллусов выделяли после трех недель культивирования при температуре 22–24°C на среде каллусогенеза и на среде регенерации. В последнем случае для выделения РНК выбирали каллусы без почек. РНК для анализа экспрессии выделяли с помощью RNeasy Plant Mini Kit (“Qiagen”, США) по методике производителя и обрабатывали ДНазой (“Qiagen”, США). Первую цепь кДНК синтезировали с помощью обратной транскриптазы MMLV (“Силекс”, Россия).

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили на амплификаторе Agilent AriaMx (“Agilent Technologies”, США) с набором реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green (“Синтол”, Россия). Синтез праймеров осуществляли в ЗАО Евроген (Россия), список и последовательности праймеров представлены в приложении (Supplementary, Table 1). Для амплификации была использована следующая программа: 1 цикл 3 мин при 95°C; 40 циклов 15 с при 95°C, 1 мин при 62°C. Анализ относительного содержания транскриптов проводили по методу 2<sup>-ΔΔCt</sup>. В качестве референсных генов использовали гены *At4g33380* и *At4g34270*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Экспрессивность фенотипа мутанта tae и время возобновления клеточных делений в листе зависят от температуры*

Фенотип растений мутантной линии характеризовался высокой вариабельностью, которая показала зависимость от температуры выращивания. При 26–28°C морфология листьев мутанта была мало отличима от дикого типа: не выявляли ни характерного сужения листовой пластинки, ни эктопических выростов (рис. 1а–в). При 22–24°C отмечены обе характерные особенности, хотя их проявление различалось по времени. Сужение листовой пластинки было заметно уже при развитии первой пары настоящих листьев (рис. 1г, д); изредка были сужены даже семядольные листья. В то же время формирование вторичного края, выростов разной морфологии и особенно почек наблюдали на зрелых листьях растений (рис. 1е), особенно — после выметывания цветоноса. Анатомия зрелых листьев, формирующих выросты [25], а также особенности пролиферативной активности клеток зрелых листьев [24] были детально исследованы ранее.

Выращивание растений при 18–20°C вызывало не только сужение, но нередко и деформацию листовой пластинки (рис. 1ж–и). У части растений (~ 15%) после формирования нескольких настоящих листьев образовывался пучок из многочисленных недоразвитых листьев (рис. 1з, к, л). Такие растения не формировали цветонос. На относительно нормально развитых листьях развивались выросты и почки (рис. 1и). Среднее число выростов и почек из расчета на лист (2.5 и 0.6, соответственно) было значительно выше, чем у растений при 22–24°C (1.0 и 0.14, соответственно). Многочисленные почки можно было обнаружить и в пазухах недоразвитых листьев (рис. 1м).

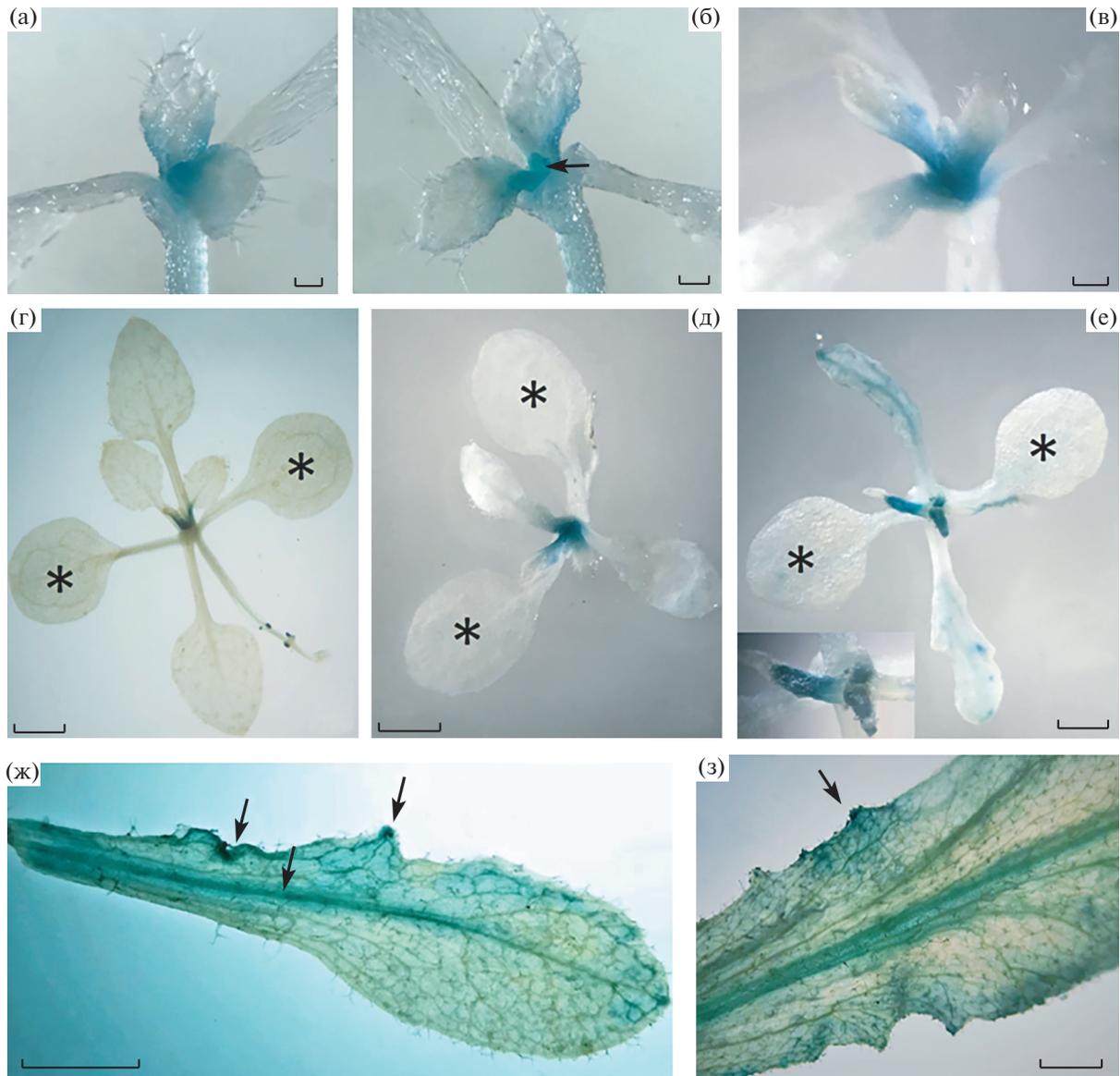
Для изучения особенностей пролиферативной активности клеток листьев использовали репортерный ген β-глюкуронидазы (GUS) под контролем промотора гена циклина *CycB1;1*, позволяющего визуализировать клетки, находящиеся на стадиях G2/M. Активную экспрессию трансгена *CycB1;1:GUS* в листьях растений *tae* при 18–20°C (как у мутанта при 22–24°C и у растений *A.thaliana* дикого типа при всех температурных режимах) можно было обнаружить на самых ранних этапах развития листового примордия. По мере роста листа ДТ и мутанта деления прекращались сначала в дистальной, а затем и в проксимальной части (рис. 2а–в), что соответствует результатам ранее проведенных исследований пролиферации клеток при развитии простого листа *A. thaliana* [26].

При 22–24°C в листьях длиннее 1 мм у ДТ и мутанта деления не выявлялись (рис. 2г, д) и возобновлялись у мутанта только в зрелых листьях [24]. При 18–20°C это возобновление можно было увидеть значительно раньше — в листьях длиной 5–10 мм ювенильных растений мутанта (рис. 2е). Более того, часть молодых листьев верхних ярусов значительно дольше сохраняли экспрессию *CycB1;1:GUS* в проксимальной и центральной частях (рис. 2е, вкладка). По-видимому, аномалии развития верхних листьев розетки при 18–20°C (рис. 1з, к–м) связаны именно с наличием эктопических клеточных делений в примордиях листа. Наиболее высокий уровень экспрессии *CycB1;1:GUS* в листьях мутанта наблюдали незадолго до зацветания и после него (рис. 2ж, з) — как и при 22–24°C [24]. Деления были сосредоточены в основном в области центральной и боковых жилок. На периферии листовых пластинок выявляли и локальные скопления делящихся клеток, которые приводили к формированию эктопических выростов (рис. 2ж, з).

Таким образом, при 18–20°C эктопические деления клеток в листьях мутанта начинались раньше, чем при более высокой температуре [24]. В результате общее число выростов и почек на листьях цветущих растений оказывалось выше, чем у растений, выращенных при 22–24°C. При раз-



**Рис. 1.** Зависимость фенотипа мутанта *tae* от температуры. Верхняя, средняя и две нижние линии – растения в условиях 26–28°C, 22–24°C и 18–20°C, соответственно. (а, б) – растения 3-недельного возраста ДТ и *tae*, соответственно; (в) – 4-недельные растения ДТ (слева) и *tae* (справа); (г, д) – растения 3-недельного возраста ДТ и *tae*, соответственно; (е) – 4-недельные растения ДТ (слева) и *tae* (справа); (ж, з) – растения в возрасте 1.5 месяца ДТ и *tae*, соответственно (верхние листья розетки *tae* прекратили рост; с – семядоли); (и) – деформированные листья 2-месячных растений мутанта с выростами и почками; (к–м) – сканирующая электронная микроскопия листьев растений *tae*, изображенных на рис (з); (к) – пучок недоразвитых листьев на верхушке побега; (л) – листья, остановившиеся в развитии на разных стадиях развития; (м) – основание одного из верхушечных листьев с многочисленными почками. Бары соответствуют 1 см (а–и), 300 мкм (к, л), 100 мкм (м) .



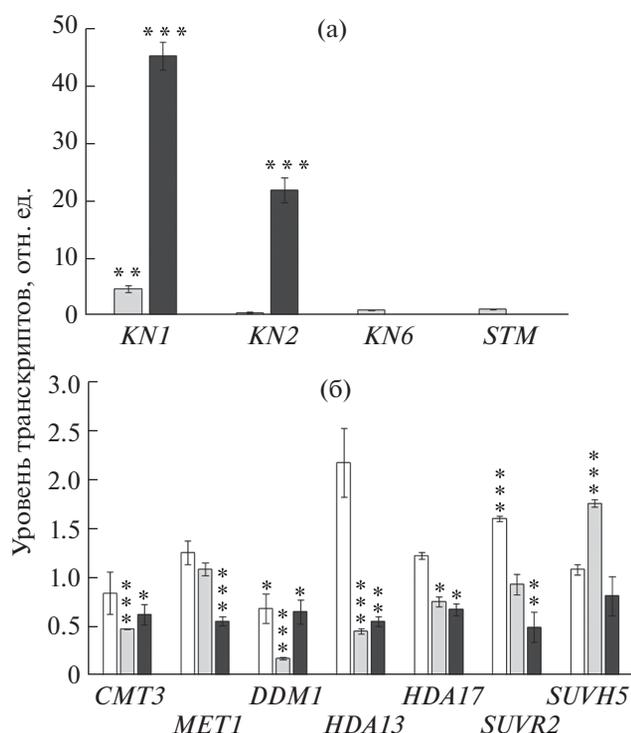
**Рис. 2.** Активность маркера клеточных делений *CycB1;1:GUS* в листьях ДТ и мутанта *tae* на разных стадиях онтогенеза. (а–в) 7-дневные проростки ДТ (а) и мутанта *tae*, выращенные при 22–24°C (а,б) и 18–20°C (в), экспрессируют трансген в апексе и основании первых настоящих листьев ((б) стрелка указывает на полностью окрашенные зачатки второй пары настоящих листьев). (г–е) – 14-дневные растения ДТ (г) и мутанта *tae* (д, е), выращенные при 22–24°C (г, д) и 18–20°C (е), экспрессируют трансген в апексе; листья ДТ (г) и мутанта (д) при 22–24°C, достигшие размера 1 мм, прекращают экспрессию трансгена; при 18–20°C (е) в листьях мутанта экспрессия трансгена выявляется в листьях размером 5–10 мм, в молодых верхних листьях (на вкладке – большее увеличение) экспрессия трансгена детектируется не только в основании, но и в центре листового зачатка; (ж–з) – зрелые листья цветущих растений мутанта, выращенных при 18–20°C (стрелки указывают на экспрессию, сосредоточенную вдоль жилок и участков, где начинают развиваться выросты,). Звездочкой обозначены семядоли. Бары соответствуют 0.1 мм (а–в), 1 мм (г–е), 1 см (ж, з).

витии простого листа у *A.thaliana* гены плюрипотентности замолкают на ранних этапах развития примордия листа, и это замолкание поддерживается эпигенетическими механизмами на протяжении всего онтогенеза [23]. Возобновление клеточных делений в листе мутанта, тестируемое по экспрессии *CycB1;1:GUS*, а позже и по появлению выростов и почек на листе, указывает на нарушение стабильности эпигенетического замолкания

генов плюрипотентности и их реактивацию в листе мутанта *tae*.

*Гены, поддерживающие недетерминированность клеток, возобновляют экспрессию на поздних стадиях развития листа мутанта tae*

Для проверки предположения о реактивации генов плюрипотентности и нарушении стабиль-



**Рис. 3.** Относительный уровень транскрипции генов в листьях мутанта *tae* разного возраста по сравнению с ДТ. Уровень экспрессии генов в листьях ДТ того же биологического возраста, что и у мутанта принят за единицу. (а) и (б) — экспрессия генов плюрипотентности и эпигенетических регуляторов соответственно. Для генов *KN6* и *STM*, которые не экспрессировались в листьях ДТ 4в, в Supplementary (Fig. 1) представлен абсолютный уровень экспрессии. Значения представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  стандартная ошибка среднего трех биологических повторностей. Звездочкой выделены статистически достоверные отличия от уровня экспрессии ДТ (*t*-тест Стьюдента, уровень значимости: \*  $0.01 < P < 0.05$ ; \*\*  $0.001 < P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ). Белый, светло серый и темный цвет — листья 2, 3 и 4 возрастов соответственно.

ности эпигенетических модификаций проведен анализ экспрессии основных генов, поддерживающих плюрипотентность клеток побеговой меристемы, а также генов, участвующих в поддержании стабильности эпигенетического молчания генов. Анализ экспрессии генов *WUS*, *STM*, *KN1*, *KN2*, *KN6* проводили в листьях разного возраста у растений мутанта и ДТ, выращенных при температуре 22–24°C. Использовали листья без почек четырех возрастов: 1в — листья длиной 2–3 мм от 7-дневных проростков, 2в — листья 5–6 мм от 14-дневных ювенильных растений, 3в — листья 17–22 мм от растений в возрасте 21 день, 4в — зрелые листья от растений с цветоносами.

Выявить экспрессию исследуемых генов плюрипотентности в молодых листьях 1в и 2в нам не удалось ни у ДТ, ни у мутанта. По-видимому, у мутанта, как и у растений ДТ, экспрессия этих ге-

нов на ранних этапах развития листа подавляется. В листьях 3в у мутанта была повышена экспрессия гена *KN1* (рис. 3а); уровень экспрессии остальных генов не отличался от контроля (листья ДТ того же возраста). В зрелых листьях 4в у мутанта наблюдалось повышение экспрессии всех генов, кроме гена *WUS*, в то время как у ДТ выявили лишь следовые количества экспрессии *KN1* и *KN2*, а экспрессия генов *KN6* и *STM* не выявлялась (рис. 3а, Supplementary Fig. 1). Время реактивации генов плюрипотентности совпадает со временем, когда в листьях возобновляются клеточные деления и экспрессия *SucB1*; *I:GUS*. Эти данные указывают на то, что активация делений является результатом возобновления экспрессии генов плюрипотентности в листьях мутанта.

*В листе мутанта tae изменена работа генов, контролирующих метилирование ДНК и модификацию гистонов*

Изучение экспрессии эпигенетических регуляторов проводили в листьях возрастов 2в, 3в, 4в (зрелый лист). Анализировали уровень экспрессии трех генов, контролирующих метилирование ДНК — *MET1* (метилирование CG-сайтов), *CMT3* (метилирование CHG-сайтов), *DDM1* (хроматин-опосредованное метилирование ДНК и гистона H3), двух генов гистоновых деацетилаз (*HDA13*, *HDA17*), гена *SUVR2*, участвующего в РНК-зависимом метилировании ДНК, а также гена *SUVH5*, кодирующего гистоновую метилтрансферазу, поддерживающую метку H3mK9 и участвующего в метилировании ДНК, зависимом от *CMT3*. Анализ экспрессии генов ДНК-метилаз *MET1* и *CMT3* не выявил различий в уровне их экспрессии в листьях 2в. В листьях 3в и 4в (зрелые листья) был снижен уровень экспрессии гена *CMT3*. Экспрессия *MET1* снижалась только в зрелых листьях 4в. Уровень экспрессии гена *DDM1* был снижен у мутанта по сравнению с ДТ в листьях всех возрастов (рис. 3б).

Уровни экспрессии генов гистоновых деацетилаз *HDA13* и *HDA17* были ниже у мутанта по сравнению с ДТ в листьях 3в и 4в, хотя в листьях 2в уровень *HDA13* был выше, чем у ДТ. Похожая динамика снижения уровня экспрессии с возрастом обнаружена и для гена *SUVR2*. В листьях 3в у мутанта выявлено транзитное повышение экспрессии гена *SUVH5*, хотя в зрелых листьях (4в) уровень экспрессии *SUVH5* был ниже, чем в листьях ДТ того же возраста (рис. 3б). Хотя анализ экспрессии отдельных представителей из разных групп эпигенетических регуляторов не дает полной картины происходящих в геноме процессов, выявленные в листьях мутанта изменения их экспрессии подтверждают предположение о процессах перепрограммирования генома, которые необходимы для реактивации генов плюрипотентности.

**Таблица 1.** Сравнение каллусогенеза и способности к регенерации побегов в культуре тканей из листьев мутанта *tae* и ДТ

Условия	Генотип	Эффективность каллусогенеза, %	Масса каллуса, мг	Каллусов с почками, %	Число почек/каллус
18–20°C	ДТ	100	540 ± 45	6.8 ± 0.8	0.1 ± 0.1
	<i>tae</i>	81.5 ± 7.0	225 ± 24	0	0
22–24°C	ДТ	100	600 ± 60	42.0 ± 5.0	0.8 ± 0.1
	<i>tae</i>	86.0 ± 8.1	450 ± 45	0	0

*Клетки из листьев мутанта tae не проявляют плюрипотентности in vitro*

Для изучения проявления плюрипотентности клеток *in vitro* использовали экспланты зрелых листьев. Каллусогенез из эксплантов мутанта *tae* оказался менее эффективным по сравнению с ДТ (табл. 1). Скорость роста каллусов мутанта также была значительно ниже, чем у каллусов ДТ. Средняя масса каллуса из листьев мутанта в конце месяца культивирования при температуре 18–20°C оказалась в 2 раза ниже, чем у каллусов ДТ (табл. 1). При 22–24°C каллусы росли лучше, однако различия между мутантом *tae* и ДТ сохранялись. Отставание в росте каллусов из мутанта сохранялось и на среде регенерации (рис. 4а, б).

Экспрессия трансгена *CycB1;1:GUS* в каллусах мутанта также оказалась ниже, чем в каллусах ДТ (рис. 4в–е). Таким образом, эктопические деления, которые характерны для листьев, в каллусах из тех же листьев не выявлялись. В отличие от каллусов из листьев ДТ, каллусы из мутанта не были способны к регенерации побегов. Эта способность не зависела от температуры (табл. 1). Доля каллусов с побегами из листьев ДТ при 18–20°C была существенно ниже, чем при 22–24°C (табл. 1). Таким образом, *in vitro* клетки мутанта демонстрировали пониженную скорость пролиферации, не проявляли способности к образованию почек даже в условиях температуры, усиливающей эктопическую пролиферацию клеток в листе *in vivo*.

Анализ экспрессии генов плюрипотентности на среде каллусогенеза и на среде регенерации выявил повышение экспрессии у мутанта по сравнению с ДТ только одного гена – *KN2* (рис. 5). Экспрессия генов *WUS* и *STM* была ниже, чем в каллусах ДТ, а уровень экспрессии гена *KN1* либо не отличался от ДТ (на среде каллусогенеза), либо был ниже (на среде регенерации).

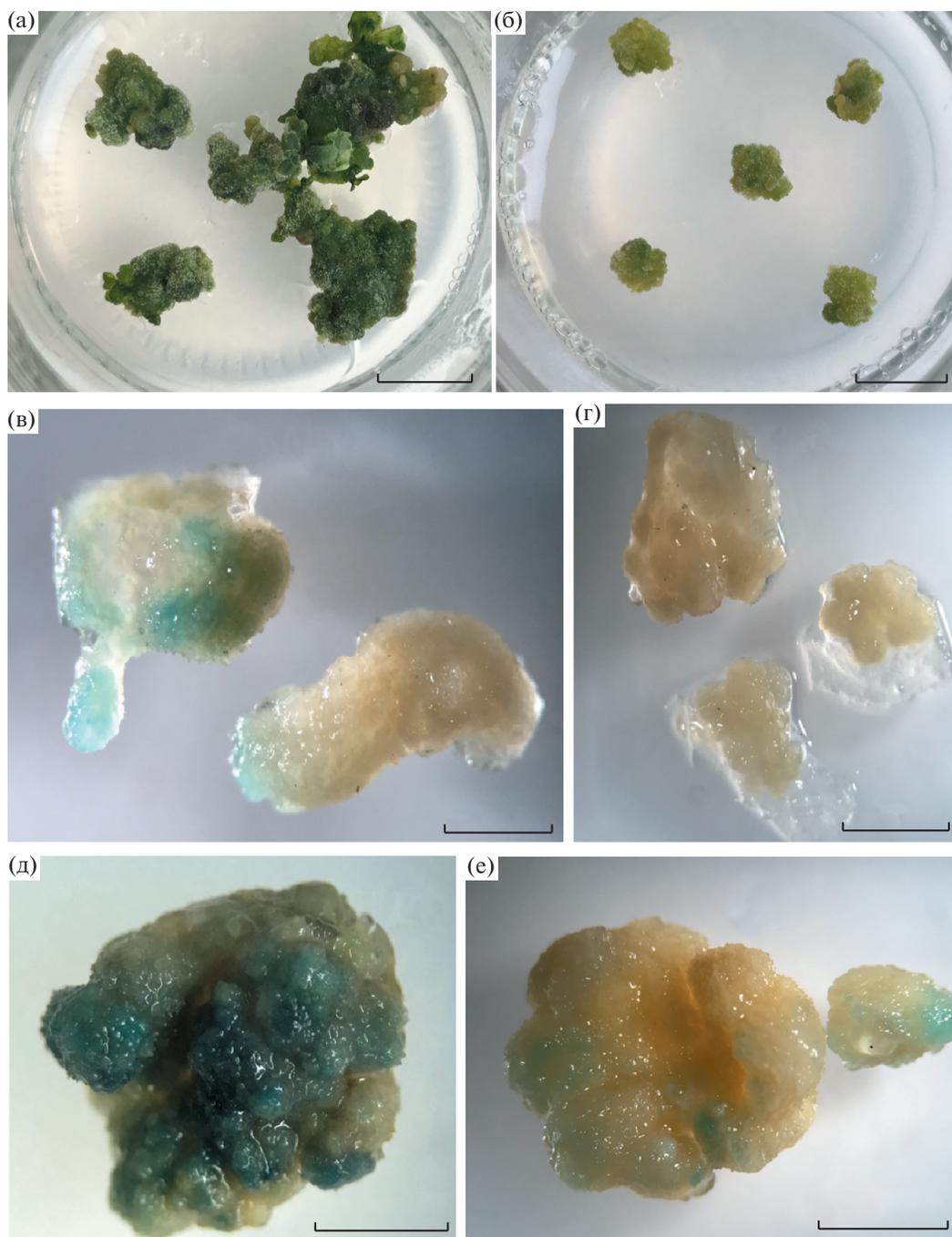
Таким образом, в культуре ткани клетки мутанта не проявляли эктопических делений и повышенной экспрессии большинства генов плюрипотентности, которая характерна для клеток зрелого листа. Эти особенности клеток мутанта не зависели от содержания экзогенных гормонов, что указывает на снижение чувствительности к экзогенным гормонам.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Пролиферация клеток листовых зачатков у проростков мутанта *tae* имела те же закономерности, что и у ДТ. Экспрессия маркера клеточных делений (трансгена *CycB1;1:GUS*) сначала наблюдалась во всем листовом зачатке, а затем прекращалась – сначала в дистальной части листовых зачатков, а затем и в проксимальной (рис. 2а–в). В листе размером более 1 мм деления не выявлялись. Дальнейший рост листа обеспечивался за счет растяжения клеток, что характерно для простого листа *A.thaliana*. Утрата пролиферации клетками листа – результат транскрипционной репрессии генов плюрипотентности на ранних стадиях его развития. Молчание генов плюрипотентности поддерживается эпигенетическими механизмами на всех последующих этапах онтогенеза, обуславливая развитие простого не рассеченного листа [23]. Усложнение структуры листа у мутанта *tae* (появление эктопических лопастей и почек на его поверхности) указывает на утрату клеточной памяти, связанную, по-видимому, с нарушением функции каких-то генов, контролирующих стабильность эпигенетических модификаций.

Нестабильность эпигенетических изменений может приводить к репрограммированию генома и активации молчащих генов плюрипотентности. На наличие такого репрограммирования указывает выявленное изменение экспрессии ряда эпигенетических регуляторов в листьях мутанта разного возраста (рис. 3б), реактивация генов плюрипотентности (рис. 3а) и возобновление клеточных делений по мере роста листа (рис. 2). Генетически обусловленные изменения в эпигенетических регуляторах у мутанта *tae*, по-видимому, влияют и на процессы каллусогенеза и регенерации *in vitro*.

О роли эпигенетических процессов в регуляции процессов каллусогенеза и регенерации *in vitro* свидетельствуют ранее полученные результаты анализа транскриптомов и динамики изменения метилирования ДНК и модификации гистоновых белков [27]. О роли эпигенетических модификаций в регуляции процессов дедифференцировки клеток эксплантов, каллусогенеза и регенерация свидетельствуют также серьезные нарушения этих процессов при мутациях в генах, осуществляющих

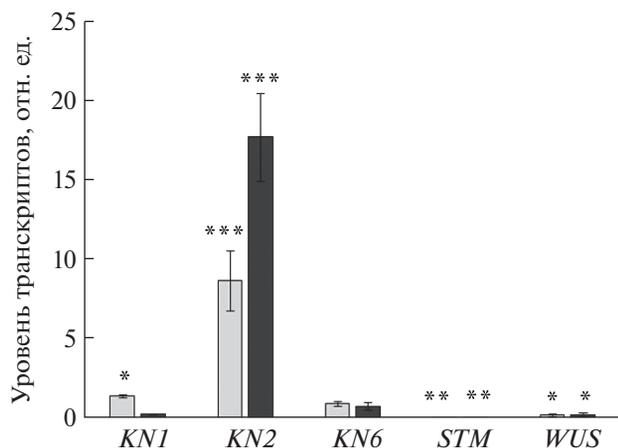


**Рис. 4.** Каллусы из листовых эксплантов. Общий вид 4-недельных каллусов ДТ (а) и мутанта *tae* (б) на среде регенерации. Экспрессия *SucB1;1:GUS* в каллусах ДТ (в, д) и мутанта *tae* (г, е) после 2 нед. (в, г) и 3 нед. (д, е) роста на среде каллусогенеза. Бары соответствуют 1 см (а, б), 2 мм (в–е).

метилирование ДНК и модификацию гистонов [10, 28, 29].

Эпигенетические модификации могут оказывать влияние на процессы каллусогенеза и регенерации, изменяя экспрессию многих генов, контролируемых гормональным гомеостазом — метаболизм гормонов и гормональный ответ. Наиболее полно исследована эпигенетическая регуляция

экспрессии генов синтеза, катаболизма и транспорта ауксина, генов ауксинового ответа [30]. Нельзя исключить, что выявленные ранее изменения ауксинового гомеостаза в линии *tae* также связаны с изменениями работы эпигенетических регуляторов. Эпигенетические изменения могут лежать и в основе нечувствительности культивируемых клеток мутанта к экзогенным гормонам, что



**Рис. 5.** Относительный уровень транскрипции генов плюрипотентности в каллусах из листьев мутанта *tae*, культивируемых на среде каллусогенеза и на среде регенерации по сравнению с ДТ. Уровень экспрессии генов в каллусах ДТ принят за единицу. Значения представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  стандартная ошибка среднего трех биологических повторностей. Звездочкой выделены статистически достоверные отличия от уровня экспрессии ДТ (*t*-тест Стьюдента, уровень значимости: \*  $0.01 < P < 0.05$ ; \*\*  $0.001 < P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ). Светло-серый и темный цвет – данные для каллусов на среде каллусогенеза и регенерации, соответственно.

отражается на эффективности каллусогенеза и регенерации листовых эксплантов *in vitro*.

Мутант *tae* обладает уникальными характеристиками анатомического строения и онтогенеза листа [24, 25], которые отличают его от ранее исследованных мутантов и трансгенных растений с эктопической экспрессией генов плюрипотентности в листе. Среди главных отличий – возобновление клеточных пролифераций и экспрессии генов плюрипотентности на поздних этапах онтогенеза листа, что указывает на нарушения у мутанта эпигенетической клеточной памяти. Эти особенности морфогенеза листа вместе с отсутствием регенерационных способностей у клеток листа мутанта *tae in vitro* делают его уникальной моделью для изучения роли эпигенетических модификаций в регуляции плюрипотентности клеток.

Электронномикроскопические исследования мутантов выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова “Электронная микроскопия в науках о жизни”. Исследование поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 19-04-00149).

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shin J., Bae S., Seo P.J. De novo shoot organogenesis during plant regeneration // J. Exp. Bot. 2020. V. 71. P. 63. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz395>
2. Chen L., Sun B., Xu L., Liu W. Wound signaling: the missing link in plant regeneration // Plant Signaling Behav. 2016. V. 11. (10): e1238548. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1238548>
3. Lup S.D., Tian X., Xu J., Perez-Perez J.M. Wound signaling of regenerative cell reprogramming // Plant Sci. 2016. V. 250. P. 178. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.06.012>
4. Ikeuchi M., Iwase A., Rymen B., Lambolez A., Kojima M., Takebayashi Y., Heyman J., Watanabe S., Seo M., Veylder L., Sakakibara H., Sugimoto K. Wounding triggers callus formation via dynamic hormonal and transcriptional changes // Plant Physiol. 2017. V. 175. P. 1158. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01035>
5. Zeng J., Dong Z., Wu H., Tian Z., Zhao Z. Redox regulation of plant stem cell fate // The EMBO J. 2017. V. 36. P. 2844. <https://doi.org/10.15252/embj.201695955>
6. Zhang H., Zhang T.T., Liu H., Shi Y., Wang M., Bie X.M., Li X.G., Zhang X.S. Thioredoxin-mediated ROS homeostasis explains natural variation in plant regeneration // Plant Physiol. 2018. V. 176. P. 2231. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00633>
7. Ikeuchi M., Shibata M., Rymen B., Iwase A., Bågman A.M., Watt L., Coleman D., Favero D.S., Takahashi T., Ahnert S.E., Brady S.M., Sugimoto K. A gene regulatory network for cellular reprogramming in plant regeneration // Plant Cell Physiol. 2018. P. 59. P. 765. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy013>
8. Huang H., Ullah F., Zhou D.X., Yi M., Zhao Y. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. P. 800. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00800>
9. Gaillochet C., Lohmann J.U. The never-ending story: from pluripotency to plant developmental plasticity // Development. 2015. V. 42. P. 2237. <https://doi.org/10.1242/dev.117614>
10. Lee Z.H., Hirakawa T., Yamaguchi N., Ito T. The roles of plant hormones and their interactions with regulatory genes in determining meristem activity // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 4065. <https://doi.org/10.3390/ijms20164065>
11. Rupp H.M., Frank M., Werner T., Strnad M., Schmullig T. Increased steady state mRNA levels of the *STM* and *KNAT1* homeobox genes in cytokinin overproducing *Arabidopsis thaliana* indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem // Plant J. 1999. V. 18. P. 557.
12. Jasinski S., Piazza P., Craft J., Hay A., Woolley L., Rieu I., Phillips A., Hedden P., Tsiantis M. KNOX action in *Arabidopsis* is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities // Curr. Biol. 2005. V. 15. P. 1560. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.023>
13. Yanai O., Shani E., Dolezal K., Tarkowski P., Sablowski R., Sandberg G., Samach A., Ori N. *Arabidopsis* KNOX1 proteins activate cytokinin biosynthesis // Curr. Biol.

2005. V. 15. P. 1566.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.060>
14. Leibfried A., To J.P., Busch W., Stehling S., Kehle A., Demar M., Kieber J.J., Lohmann J.U. *WUSCHEL* controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators // *Nature*. 2005. V. 438. P. 1172.  
<https://doi.org/10.1038/nature04270>
  15. Ma Y., Miotk A., Šutiković Z., Ermakova O., Wenzl C., Medzihradský A., Gailloch C., Forner J., Utan G., Brackmann K., Galván-Ampudia C.S., Vernoux T., Greb T., Lohmann J.U. *WUSCHEL* acts as an auxin response rheostat to maintain apical stem cells in *Arabidopsis* // *Nat. Commun.* 2019. V.10. P.5093.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-13074-9>
  16. Barton M.K., Poethig R.S. Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the *shoot meristemless* mutant // *Development*. 1993. V. 119. P. 823.
  17. Gordon S.P., Heisler M.G., Reddy G.V., Ohno C., Das P., Meyerowitz E.M. Pattern formation during *de novo* assembly of the *Arabidopsis* shoot meristem // *Development*. 2007. V. 134. P. 3539.  
<https://doi.org/10.1242/dev.010298>
  18. Zhang T.Q., Lian H., Zhou C.M., Xu L., Jiao Y., Wang J.W. A two-step model for *de novo* activation of *WUSCHEL* during plant shoot regeneration // *Plant Cell*. 2017. V. 29. P. 1073.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.16.00863>
  19. Byrne M.E., Barley R., Curtis M., Arroyo J.M., Dunham M., Hudson A., Martienssen R.A. Asymmetric leaves 1 mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis* // *Nature*. 2000. V. 408. P. 967.  
<https://doi.org/10.1038/35050091>
  20. Ori N., Eshed Y., Chuck G., Bowman J.L., Hake S. Mechanisms that control *KNOX* gene expression in the *Arabidopsis* shoot // *Development*. 2000. V. 127. P. 5523.
  21. Semiarti E., Ueno Y., Tsukaya H., Iwakawa H., Machida C., Machida Y. The *ASYMMETRIC LEAVES2* gene of *Arabidopsis thaliana* regulates formation of asymmetric lamina, establishment of venation and repression of meristem-related homeobox genes in leaves // *Development*. 2001. V. 128. P. 1771.
  22. Ha C.M., Jun J.H., Nam H.G., Fletcher J.C. *BLADE-ON-PETIOLE 1* and 2 control *Arabidopsis* lateral organ fate through regulation of LOB domain and adaxial-abaxial polarity genes // *The Plant cell*. 2007. V. 19. P. 1809.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.107.051938>
  23. Hay A., Tsiantis M. *KNOX* genes: versatile regulators of plant development and diversity // *Development*. 2010. V. 137. P. 3153.  
<https://doi.org/10.1242/dev.030049>
  24. Ежова Т.А., Куприянова Е.В. Изучение роли ауксина в регуляции развития эктопических выростов на листьях мутанта *taeniata Arabidopsis thaliana* // *Онтогенез*. 2019. Т. 50. С. 312.  
<https://doi.org/10.1134/S0475145019050057>
  25. Fedotov A.P., Ezhova T.A., Timonin A.C. Bizarre lamina margins in *tae* mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae) // *Wulfenia*. 2017. V. 24. P. 163.
  26. Donnelly P.M., Bonetta D., Tsukaya H., Dengler R.E., Dengler N.G. Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of *Arabidopsis* // *Dev. Biol.* 1999. V. 215. P. 407.  
<https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9443>
  27. Lee K., Seo P.J. Dynamic epigenetic changes during plant regeneration // *Trends Plant Sci.* 2018. V. 23. P. 235.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.11.009>
  28. Li W., Liu H., Cheng Z.J., Su Y.H., Han H.N., Zhang Y., Zhang X.S. DNA methylation and histone modifications regulate *de novo* shoot regeneration in *Arabidopsis* by modulating *WUSCHEL* expression and auxin signaling // *PLoS Genet.* 2011. V. 7:e1002243.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002243>
  29. He C., Chen X., Huang H., Xu L. Reprogramming of H3K27me3 is critical for acquisition of pluripotency from cultured *Arabidopsis* tissues // *PLoS Genet.* 2012. V. 8. e1002911.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002911>
  30. Mateo-Bonmatí E., Casanova-Sáez R., Ljung K. Epigenetic regulation of auxin homeostasis // *Biomolecules*. 2019. V. 9. P. 623.  
<https://doi.org/10.3390/biom9100623>

## СРАВНЕНИЕ РЕДОКС-СОСТОЯНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ И АСКОРБАТОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ У ВАКУОЛЕЙ И ЛЕЙКОПЛАСТОВ КЛЕТОК КОРНЕПЛОДОВ СТОЛОВОЙ СВЕКЛЫ В ПЕРИОД ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО ПОКОЯ

© 2021 г. Е. В. Прадедова<sup>а</sup>, \*, О. Д. Нимаева<sup>а</sup>, Н. В. Семенова<sup>а</sup>, Р. К. Саляев<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

\*e-mail: praded@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 07.02.2020 г.

После доработки 16.05.2020 г.

Принята к публикации 16.05.2020 г.

Проведено сравнительное исследование содержания аскорбиновой кислоты и аскорбатоксидазной активности (АО-активности) у вакуолей и лейкопластов клеток корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.). Установлено, что вакуоли аккумулировали больше аскорбиновой кислоты (АК<sub>сум</sub>) по сравнению с пластидами. Содержание окисленной формы аскорбиновой кислоты, а именно дегидроаскорбиновой кислоты (ДАК), в вакуолях также было выше. Однако, величины соотношений восстановленной формы аскорбиновой кислоты (АК) к окисленной форме (АК/ДАК) у вакуолей и лейкопластов оказались близкими. Для исследуемых органелл была характерна относительно высокая АО-активность. Реакции оксидазного окисления АК в вакуолях катализировала аскорбатоксидаза, а в лейкопластах – аскорбатоксидаза и полифенолоксидаза. Окисляющие АК оксидазы, вероятно, регулируют редокс-состояние аскорбиновой кислоты в этих органеллах.

**Ключевые слова:** *Beta vulgaris* L., аскорбиновая кислота, аскорбатоксидаза, вакуоль, пластиды

DOI: 10.31857/S0015330321010140

### ВВЕДЕНИЕ

Физиологическое действие аскорбиновой кислоты обусловлено обратимостью процессов ее окисления и восстановления. В ходе реакций окисления от восстановленной аскорбиновой кислоты (АК) к акцепторам переходят один электрон ( $e^-$ ) или два  $e^-$  (и два  $H^+$ ). В первом случае образуется нестабильное, но реакционноспособное соединение – монодегидроаскорбат-радикал (МДА). Во втором случае образуется дегидроаскорбат (ДАК) – более стабильная реакционноспособная окисленная форма аскорбиновой кислоты [1]. Эти окисленные формы, в свою очередь, принимают восстановительные эквиваленты и переходят в енольную форму АК. Благодаря обратимому окислению-восстановлению аскорбиновая кислота выполняет функцию эффективного пере-

носчика водорода ( $H^+ + e^-$ ) в ферментативных реакциях и вносит весомый вклад в окислительно-восстановительные процессы клетки.

В клетках растений АК, МДА и ДАК находятся, главным образом, в свободном состоянии. Как правило, преобладает АК, хотя в отдельных случаях накапливается ДАК [2]. Соотношение двух форм аскорбиновой кислоты АК/ДАК может служить показателем физиологического состояния растения в онтогенезе: преимущественное накопление АК – признак высокой интенсивности процессов жизнедеятельности; повышение содержания ДАК – низкая интенсивность жизнедеятельности [2]. Кроме того, соотношение АК/ДАК, характеризующее редокс-состояние аскорбиновой кислоты, может быть маркером физиологического состояния органов, тканей и клеток в стрессирующих условиях. Воздействие стрессорного фактора приводит к повышению интенсивности окислительных процессов (вследствие активации защитных механизмов), которое, как правило, сопровождается уменьшением величин соотношений АК/ДАК или АК/АК<sub>сум</sub> [3, 4]. С помощью этих соотношений можно оценивать ре-

**Сокращения:** АК – аскорбиновая кислота; АО – аскорбатоксидаза; аскорбатоксидазная активность – АО-активность; ДАК – дегидроаскорбат; ДАВ – 3,3'-диаминобензидин; DCPH – 2,6-дихлорфенолиндофенол; DTNB – 5,5'-дитиобис-2-(нитробензойная кислота); МДА – монодегидроаскорбат; ПО – фенольная пероксидаза; PPD – п-фенилендиамин; ПФО – полифенолоксидаза.

докс-состояния не только органов, тканей и клеток, но и отдельных клеточных компартментов. Аскорбиновая кислота сосредоточена практически во всех органеллах клетки, цитозоле и апопластном пространстве, в которых выполняет определенные функции [3, 5]. Ее редокс-состояние изменяют низкомолекулярные прооксиданты (активные формы кислорода, окисленные фенолы и токоферол, и др.) и ферменты, для которых она выступает в роли кофактора (монооксигеназы, диоксигеназы, пролингидроксилазы и др.), неспецифического субстрата (фенолазы, фенольная пероксидаза и др.) и специфического субстрата (аскорбатпероксидаза, аскорбатоксидаза и др.) [1–5].

Аскорбиновая кислота (АК, МДА, ДАК) и специфично взаимодействующие с ней ферменты (аскорбатпероксидаза, аскорбатоксидаза, монодегидроаскорбатредуктаза, дегидроаскорбатредуктаза и др.) объединены в систему аскорбиновой кислоты [1, 2]. Эта система частично охарактеризована у митохондрий, хлоропластов, пероксисом, цитозоля, а также у апопласта [1, 6]. В то же время ее наличие в центральной вакуоли ранее не рассматривалось, несмотря на некоторые факты, указывающие на вакуолярную локализацию аскорбиновой кислоты и аскорбат-зависимых ферментов. Например, показано накопление аскорбиновой кислоты в вакуолях *Armoracia rusticana* и *Vicia faba* [7, 8], а в изолированных вакуолях *Arabidopsis thaliana* с помощью протеомного анализа выявлены апоферменты аскорбатпероксидазы (КФ 1.11.1.11) и дегидроаскорбатредуктазы (КФ 1.8.5.11) [9]. В вакуолях *Cucurbita maxima* с помощью иммуноферментного анализа с применением электронной микроскопии обнаружена аскорбатоксидаза (АО, КФ 1.10.3.3) [10]. На основании этих данных можно предположить функционирование системы аскорбиновой кислоты в вакуолях клеток растений.

Цель настоящей работы заключалась в изучении этой системы у вакуолей клеток корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.). В рамках проводимого исследования решались следующие задачи. Прежде всего, следовало определить содержание аскорбиновой кислоты и ее редокс-состояние. Затем следовало выявить ферменты, для которых аскорбиновая кислота служила субстратом, и которые изменяли ее редокс-состояние. Основное внимание на этом этапе исследования было уделено аскорбатоксидазной активности (АО-активности) вакуолей.

Оценить содержание и редокс-состояние аскорбиновой кислоты, а также активность аскорбатоксидающих ферментов в вакуолях позволяет сравнение с другими структурами клетки. Наиболее подходящими объектами для сравнения могли быть пластиды, в которых система аскорбиновой кислоты ранее исследовалась в рамках аскорбат-

глутатионового цикла. В связи с этим, главными объектами настоящего исследования были вакуоли и лейкопласты, которые изолировали из корнеплодов столовой свеклы в период их физиологического покоя.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объект исследования.** Растения столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.) сорта Бордо выращивали на опытном участке Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН. Корнеплоды свеклы хранили при 4°C.

**Выделение органелл.** Макрообъемный метод выделения вакуолей из ткани корнеплодов применяли в некоторой модификации [11]. Фракция вакуолей подвергалась дополнительной очистке в ступенчатом градиенте плотности (1.050–1.080–1.145–1.180 г/см<sup>3</sup>), составленном из растворов 1 М КСl и 1.8 М сахарозы, которые готовили на основе буфера 20 мМ Трис-НСl, рН 7.4. Градиент центрифугировали в течение 20 мин при 125 g. Чистоту фракций контролировали с помощью маркерных ферментов вакуолей и других клеточных структур [12], а также с помощью световой микроскопии.

Пластиды изолировали из корнеплодов, используя общепринятый подход с некоторой модификацией, которая заключалась в изменении ступенчатого градиента плотности для очистки органелл. Он состоял из растворов, содержащих среду выделения (1 мМ ЭДТА, 10 мМ NaCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.5 мМ КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, 50 мМ НЕРЕС-КОН, рН 7.6) и разные концентрации Percoll (10–22–35–60%). Градиент центрифугировали в течение 5 мин при 9200 g [13]. Поскольку в клетках корнеплода сосредоточены главным образом лейкопласты, то наиболее чистую фракцию пластид собирали на границе слоев с 22–35% Percoll.

**Получение водных экстрактов из ткани корнеплода и выделенных органелл.** Ткань корнеплода растирали в среде для экстракции, содержащей 2 мМ фенилметилсульфонил фторида, 0.1% нерастворимого поливинилпирролидона, 50 мМ Na<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub>/КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> (рН 7.8). Изолированные вакуоли помещали в указанную среду для экстракции, в которой они легко разрушались. Изолированные пластиды разрушали в этой же среде при помощи многократного замораживания-оттаивания, используя для этих целей жидкий азот. Полученные экстракты центрифугировали в течение 10 мин при 13 500 g.

**Определение аскорбиновой кислоты.** Для определения АК использовали метод ВЭЖХ. К образцам добавляли 0.1% раствор метафосфорной кислоты (в конечной концентрации), затем центрифугировали в течение 15 мин при 13500 g. Супернатант очищали с помощью картриджа Sep-Pak C18 [14]. Фильтрат делили на две равные части, получая в

дальнейшем два образца. Одну часть оставляли без изменения, в ней определяли АК. Другую часть инкубировали 10 мин с 5 мМ ДТТ, в результате ДАК восстанавливалась до АК. В этой части определяли содержание “суммарной аскорбиновой кислоты” ( $AK_{\text{сум}} = АК + ДАК$ ). Количественное определение проводили на жидкостном микроколочном хроматографе Милихром А-02 (ООО ИХ “ЭкоНова”, Россия): колонка  $2 \times 75$  мм; сорбент ProntoSil-120-5-C18 AQ#0838 (обращеннофазный). Изократическое элюирование осуществляли раствором, содержащим метанол и воду (15 : 85), pH 2.5, скорость потока 0.2 мл/мин. Детекция проходила при длине волны 248 нм. С помощью спектрофотометрического метода определяли АК и  $AK_{\text{сум}}$ , используя реагент 2,6-дихлорфенолиндофенол (DCPIP). Измерения проводили на планшетном фотометре ImmunoChem-2100 (“High Technology” США) согласно ранее описанному методу [15].

**Определение ферментативной активности.** С помощью спектрофотометрического метода в исследуемых образцах определяли АО-активность. Оптическую плотность регистрировали при 265 нм [16]. Реакционная среда содержала 0.8 мМ АК и 50 мМ  $Na_2HPO_4/NaH_2PO_4/Na_3PO_4$  (pH 4.0–5.0–6.0–7.0–8.0–9.0). Для подавления ферментативной активности использовали ингибиторы: 10 мМ трополон (2-гидрокси-2.4.6-циклогептатриен); 30 мМ DTNB (5,5'-дителиобис-(2-нитробензойная кислота); 50 мМ  $NaN_3$ ; 1 мМ ЭДТА. АО-активность выражали в нмоль АК на мг белка, концентрацию последнего определяли с помощью метода Бредфорд.

Активность определяли также в ПААГ после электрофореза белков при неденатурирующих условиях (CN-PAGE). Для разделения анионных белков использовали Трис/глициновую систему и 7% ПААГ. Для разделения катионных белков использовали систему  $\beta$ -аланин/уксусная кислота и 6% ПААГ [12]. В пластинах геля визуализировали активность аскорбатоксидазы, фенольной пероксидазы и полифенолоксидазы.

АО-активность выявляли с помощью ранее описанного метода [17]. Пластины ПААГ помещали в реакционные среды, содержащие 4 мМ АК и буфер с разными значениями pH: 1) 100 мМ  $Na_2HPO_4/NaH_2PO_4$ , pH 6.0 или pH 8.0; 2) 100 мМ Трис/HCl, pH 6.0 или pH 8.0. После 10-мин инкубации гели споласкивали дистиллированной водой и обрабатывали красителем DCPIP (0.025%).

Активность фенольной пероксидазы (ПО) визуализировали в пластинах геля, которые помещали в реакционную среду, содержащую: 100 мМ  $Na_2HPO_4/NaH_2PO_4$  (pH 6.0), 0.01%  $H_2O_2$ , 0.07 мМ 3,3'-диаминобензидина-4HCl (DAB) [17].

Активность полифенолоксидазы (ПФО) проявлялась в пластинах геля, когда их инкубировали в реакционной среде, содержащей 50 мМ  $Na_2HPO_4/NaH_2PO_4$  (pH 6.0 или pH 8.0), 50 мМ пирокатехина (1.2-дигидроксibenзола) и 0.93 мМ п-фенилендиамин (PPD) [17].

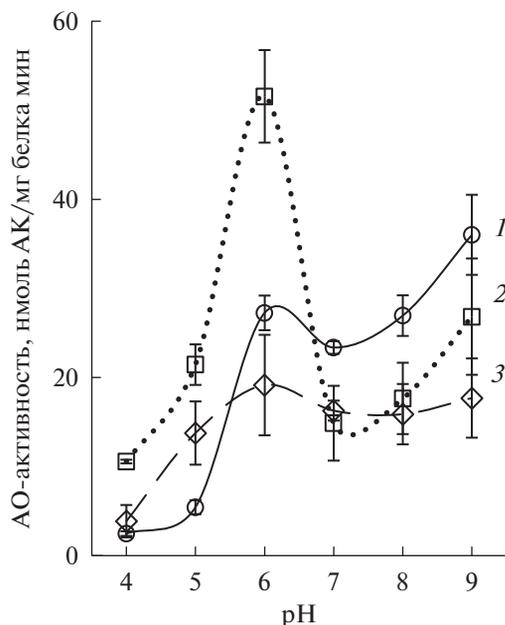
**Эксперимент с пероксидазой хрена.** Фенольные пероксидазы растений катализируют реакции пероксидазного и оксидазного окисления субстратов. Подтвердить причастность вакуолярных ПО к пероксидазному и оксидазному окислению исследуемых субстратов позволяет эксперимент с пероксидазой из корней хрена, которая также имеет вакуолярную локализацию. Активность очищенной пероксидазы хрена (“Sigma”, США) определяли двумя указанными методами в тех же условиях.

**Статистическая обработка данных.** Эксперименты повторяли не менее пяти раз, используя три аналитические пробы. В ходе статистического анализа применяли такие показатели, как среднее арифметическое значение и стандартное отклонение. Они представлены в таблицах и графиках. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) и апостериорный тест Тьюки использовали для оценки статистически значимых различий между величинами концентраций аскорбиновой кислоты, которые приведены в таблице.

**Таблица 1.** Содержание аскорбиновой кислоты в изолированных органеллах и экстрактах ткани

Образец	Концентрация аскорбиновой кислоты, мкМ /мг белка					
	метод	АК	ДАК	$AK_{\text{сум}}$	АК/ДАК	АК/ $AK_{\text{сум}}$
Вакуоли	Спектрофотометрия	$2.21 \pm 0.23^*$	$2.18 \pm 0.25$	$4.39 \pm 0.48$	1.01	0.50
	ВЭЖХ	$3.16 \pm 0.19^*$	$1.79 \pm 0.39$	$4.95 \pm 0.58$	1.77	0.64
Пластиды	Спектрофотометрия	$0.41 \pm 0.11^*$	$0.35 \pm 0.09^*$	$0.76 \pm 0.2^*$	1.17	0.54
	ВЭЖХ	$0.27 \pm 0.09^*$	$0.14 \pm 0.03^*$	$0.41 \pm 0.11^*$	1.93	0.66
Экстракт ткани	Спектрофотометрия	$4.15 \pm 1.02^*$	$5.73 \pm 1.19$	$9.88 \pm 2.21$	0.72	0.42
	ВЭЖХ	$5.38 \pm 0.32^*$	$6.70 \pm 1.56$	$12.08 \pm 1.88$	0.81	0.45

Примечание: различия между образцами (вакуоли, пластиды и экстракт ткани) достоверны при  $P < 0.05$ . \* – величины концентраций АК, ДАК и  $AK_{\text{сум}}$ , статистически достоверно отличающиеся от величин концентраций соответствующих соединений, которые определяли другим методом.



**Рис. 1.** Изменение АО-активности в зависимости от pH среды. 1 — изолированные вакуоли; 2 — экстракт ткани; 3 — изолированные пластиды.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Содержание аскорбиновой кислоты

Самое высокое содержание аскорбиновой кислоты ( $AK_{\text{сум}}$ ) установлено в экстрактах ткани, в которых концентрация ДАК превышала концентрацию АК. В результате соотношение АК/ДАК оказалось низким и соответствовало 0.72 или 0.8 (в зависимости от метода определения) (табл. 1). В то же время, в вакуолях и пластидах содержание АК превосходило содержание ДАК, поэтому соотношение АК/ДАК было выше: у вакуолей — 1.01 или 1.77; у пластид — 1.17 или 1.93. При этом вакуоли аккумулировали намного больше аскорбиновой кислоты по сравнению с лейкопластами.

Результаты, полученные с помощью разных методов, несколько различались. Если аскорбиновую кислоту определяли с помощью ВЭЖХ, то во всех исследуемых образцах концентрации АК были выше, а концентрации ДАК были ниже таковых, установленных с помощью спектрофотометрического анализа. В результате величины редокс-соотношений АК/ДАК и АК/ $AK_{\text{сум}}$  также были выше (табл. 1). Наблюдаемый эффект, вероятно, обусловлен ошибкой спектрофотометрического метода, в котором следует учитывать влияние пигментов и неспецифичную реакцию красителя. Для этого необходимо вводить дополнительные контрольные варианты и производить соответствующие вычисления. В то же время, такие контрольные варианты не требуются для ВЭЖХ.

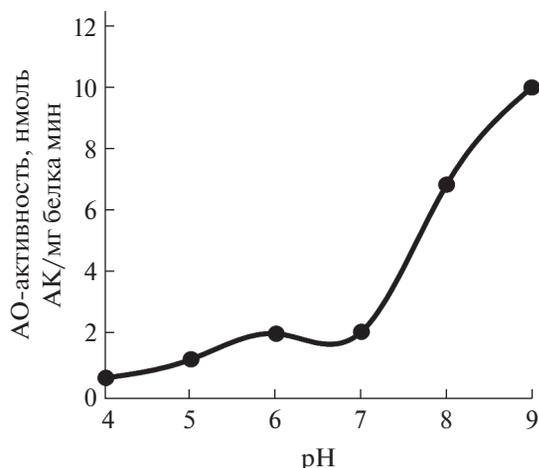
Несмотря на некоторые различия в концентрациях аскорбиновой кислоты при определении разными методами, сравнение между собой вакуолей, пластид и экстрактов ткани позволяло выявить одну и ту же картину. Во-первых, независимо от способа измерения, концентрация  $AK_{\text{сум}}$  в вакуолях была на порядок выше, чем в пластидах. Во-вторых, в вакуолях и пластидах содержание АК превосходило содержание ДАК, тогда как в тканевом экстракте, наоборот, ДАК было больше, чем АК. В-третьих, величины соотношений АК/ДАК и АК/ $AK_{\text{сум}}$ , полученные для вакуолей, были близки соответствующим величинам, полученным для пластид (табл. 1).

### Аскорбатоксидазная активность

В клетках растений разные ферменты окисляют АК, изменяя ее редокс-состояние. В настоящей работе внимание уделено АО, так как некоторые факты из более ранних работ указывали на возможное присутствие фермента в вакуолях растительных клеток [10].

В вакуолях корнеплодов столовой свеклы мы выявили АО-активность (рис. 1). Она оказалась относительно высокой и превышала таковую пластид. Однако самая высокая активность была в экстрактах ткани. Ее максимальные значения приходились на pH 6.0, хотя активность оставалась относительно высокой в довольно широком диапазоне pH (pH 6.0–9.0) как у экстрактов ткани, так и других исследуемых объектов (рис. 1). На графике у кривых, отображающих изменение АО-активности вакуолей и тканевого экстракта, видны два пика. Они соответствовали pH 6.0 и 9.0. В то же время у лейкопластов единственный пик приходился на pH 6.0. Он был нечетко выражен, так как активность незначительно снижалась при pH 7.0, 8.0 и 9.0.

Возможно, два пика у кривых формировались вследствие окисления АК сразу несколькими ферментами, оптимальные pH для которых сильно различались. В своих более ранних исследованиях мы показали наличие фенольной пероксидазы (ПО) в вакуолях клеток корнеплодов столовой свеклы [18]. Известно, что АК служит субстратом для ПО. Например, пероксидаза из корней хрена катализировала реакции пероксидазного окисления АК в слабокислых и нейтральных условиях [19]. Однако нас интересовала способность ПО катализировать реакции оксидазного окисления АК. Чтобы оценить вклад этого фермента в АО-активность, мы провели эксперимент с пероксидазой хрена. Как оказалось, ее активность с АК в отсутствие  $H_2O_2$  (в оксидазных реакциях) была довольно низкой (рис. 2). Повышение активности происходило только в средах с pH 8.0 и, особенно, pH 9.0. Таким образом, в условиях нашего эксперимента можно было ожидать небольшой вклад



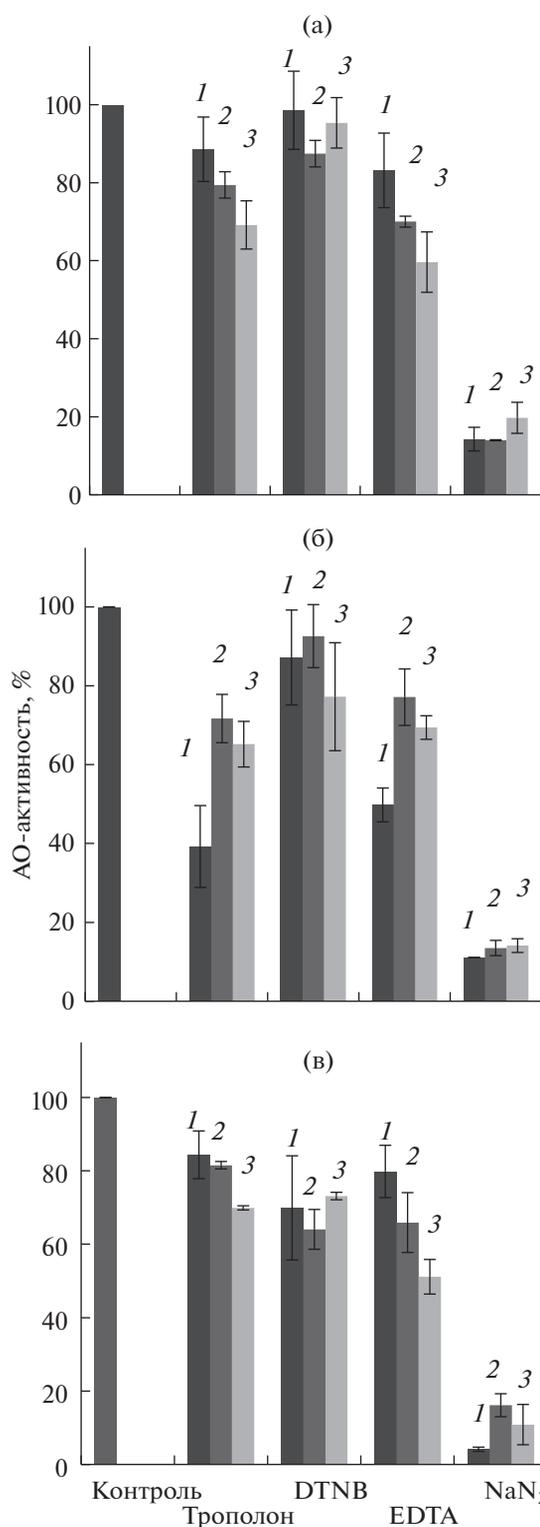
**Рис. 2.** Изменение активности пероксидазы хрена в реакциях окисления аскорбиновой кислоты в отсутствие  $H_2O_2$  (АО-активность) в зависимости от pH реакционной среды.

ПО вакуолей и тканевого экстракта в АО-активность при pH 9.0, на который приходился второй пик ферментативной активности на графиках (рис. 1). Первый пик, соответствующий pH 6.0, по всей видимости, отражал уровень активности АО.

*Ингибиторный анализ*

В растительном организме оксидазные реакции, в которых АК выступает в качестве доноров восстановительных эквивалентов для  $O_2$ , катализируют не только АО, но и другие оксидазы, например, фенолазы (ПФО и лакказы) [2]. В пероксидазных реакциях АК окисляют аскорбатпероксидазы и ПО [2, 19]. В связи с этим, у исследуемых образцов следовало оценить вклад в АО-активность других оксидоредуктаз, окисляющих АК. Для этого использовали ингибиторы: 1) трополон, подавляющий ПФО; 2) DTNB, инактивирующую лакказы; 3) ЭДТА, которая подавляла активность ПФО и ПО и, согласно данным из литературы, практически не влияла на активность АО; 4)  $NaN_3$ , подавляющий все рассматриваемые оксидоредуктазы [18, 20, 21]. В некоторых работах для подавления АО применяли диэтилдитиокарбамат или салицилальдоксим [2, 20]. В нашем случае исследование с применением этих хелатных реагентов было бы неинформативным, так как они ингибировали многие металлсодержащие ферменты, в том числе ПФО и лакказы [21].

Используемые ингибиторы вносили в реакционные среды с разными pH (pH 6.0, 8.0, 9.0). Как оказалось, их эффект зависел от pH реакционной среды. Исключение составлял **азид натрия**, при котором снижение АО-активности на 80–90% было отмечено в средах с pH 6.0, 8.0 и 9.0 у всех исследуемых объектов (рис. 3а–в).



**Рис. 3.** Влияние ингибиторов на АО-активность. 1 – условия с pH 6.0; 2 – условия с pH 8.0; 3 – условия с pH 9.0. (а) – вакуоли; (б) – пластиды; (в) – экстракт ткани.

В то же время, с трополоном заметное снижение АО-активности у вакуолей и тканевого экстракта происходило в реакционных средах с рН 9.0 (рис. 3а, в). Ранее мы показали снижение активности вакуолярной ПО в пероксидазных и оксидазных реакциях в среднем на 30%, если реакционные среды содержали трополон [18]. В связи с этим, наблюдаемый эффект в условиях с рН 9.0 можно объяснить некоторым снижением активности ПО. Трополон оказался более эффективным в случае пластид, у которых АО-активность снижалась в среднем на 60% в слабокислых условиях (рН 6.0) (рис. 3б). По всей видимости, это снижение было вызвано подавлением ПФО, так как трополон является сильнодействующим ингибитором для этого фермента. В средах с рН 8.0 и 9.0, содержащих трополон, ферментативная активность снижалась лишь на 20–30%. Вероятно, в этих условиях вклад ПФО в АО-активность был незначительным, а вклад АО, наоборот, был существенным.

DTNB (признанный ингибитор лакказ) оказалась малоэффективной в случае вакуолей и пластид (рис. 3,б). Однако в экстрактах ткани АО-активность снижалась в среднем на 30%. Возможно, экстракты ткани содержали окисляющие АК оксидоредуктазы, которые подавляла DTNB.

Эффект ЭДТА также зависел от рН-условий. АО-активность снижалась у пластид в среднем на 50% при рН 6.0, а у вакуолей и тканевого экстракта – на 20–40% при рН 8.0 и 9.0. Очевидно, что АО-активность пластид понижалась вследствие подавления ПФО. В то же время, незначительное снижение АО-активности у вакуолей и тканевого экстракта в среде с рН 6.0, возможно, происходило из-за слабого инактивирования АО, которая менее подвержена ингибирующему действию ЭДТА.

В целом, результаты ингибиторного анализа показали, что АК в исследуемых образцах окисляли оксидоредуктазы, подавляемые азидом натрия. Разные эффекты трополона и ЭДТА были обусловлены величинами рН реакционной среды, что косвенно указывало на функционирование разных рН-зависимых ферментов. Подавление АО-активности трополоном и ЭДТА при рН 6.0 (в среднем на 50%) у лейкопластов свидетельствовало о значительном вкладе в эту активность ПФО. У вакуолей в этих условиях, по всей видимости, преобладала активность аскорбатоксидазы.

#### *Определение активности АО в ПААГ*

Метод, с помощью которого выявляли активность АО в ПААГ, предусматривал применение ДСРIP [17]. Это синий хиноидный краситель, который восстанавливается АК до бесцветного соединения (лейко-формы ДСРIP) [15]. Мы модифицировали метод, изменив способ нанесения

раствора ДСРIP на пластину геля. На основе этого раствора готовили 1% агарозный гель, который формировали на поверхности исследуемого ПААГ. Поскольку ПААГ (согласно протоколу, см. раздел Материалы и методы) предварительно инкубировали в реакционных средах, содержащих АК, то расположенный на его поверхности изначально окрашенный агарозный гель довольно быстро обесцвечивался. Синее окрашивание в агарозном геле сохранялось только в зонах локализации фермента.

Следует отметить, что в этом методе предусмотрено применение сразу двух субстратов АО, а именно АК и ДСРIP. В более ранних работах была продемонстрирована способность АО окислять ДСРIP (лейко-формы) [22]. Оптимальный рН для такой реакции был рН 7.5, тогда как оптимальный рН для реакции окисления АК был рН 6.0 [20, 22, 23]. Поскольку, согласно протоколу, реакционная среда должна содержать Трис-буфер с рН 8.0, то можно предположить, что в этих условиях при участии фермента будет окисляться преимущественно восстановленный ДСРIP. Чтобы подтвердить это предположение, мы применили две реакционные среды с Трис-буфером, которые различались значениями рН (рН 6.0 и 8.0). Наряду с указанными средами, использовали среды с фосфатным буфером с рН 6.0 и рН 8.0 для выявления активности ПО и ПФО.

Как отмечалось выше, ферментативную активность визуализировали в ПААГ после электрофоретического разделения отрицательно и положительно заряженных белков при неденатурирующих условиях (CN-PAGE). К сожалению, из-за низкой стабильности АО корнеплодов столовой свеклы мы не могли использовать изоэлектрическое фокусирование белков (ИЭФ) – более приемлемый подход для такого исследования.

**Вакуоли.** Если пластины геля с отрицательно заряженными белками инкубировали в реакционной среде с фосфатным буфером, содержащим субстраты, то проявлялась активность анионных изоформ ПО, которые катализировали: пероксидазное окисление DAB (рН 6.0); оксидазное окисление пирокатехина (рН 8.0); окисление АК или ДСРIP (рН 6.0) (рис. 4б–г). Следует отметить, что зоны, окрашенные ДСРIP, довольно быстро исчезали (в течение 30 мин). Возможно, в условиях эксперимента, когда ДСРIP восстанавливался АК, ПО окисляла главным образом восстановленный краситель, а не АК. Предположительная последовательность окислительно-восстановительных реакций:



или ДАК(оптимальный рН 6.0).

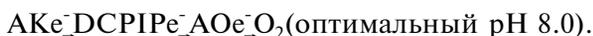
Очевидно, что требуется отдельное исследование этих реакций.

**Рис. 4.** Ферментативная активность в ПААГ после электрофоретического разделения отрицательно заряженных белков: (а) – маркерные белки; (б) – активность пероксидазы с DAB в реакционной среде, содержащей фосфатный буфер с pH 6.0; (в) – полифенолоксидазная активность с пирокатехином и PPD в среде с фосфатным буфером с pH 8.0 (для образцов вакуолей, экстрактов ткани и пероксидазы хрена) и среде с фосфатным буфером с pH 6.0 (для образцов пластид); (г) – АО-активность в реакционной системе, содержащей субстраты АК и DСPIР, а также фосфатный буфер с pH 6.0; (д) – АО-активность в среде с фосфатным буфером с pH 8.0; (е) – АО-активность в среде с Трис-буфером с pH 6.0; (ж) – АО-активность в среде с Трис-буфером с pH 8.0. 1, 3, 4, 5 – изоформы пероксидазы (в образцах вакуолей, экстрактов ткани) или изоформы полифенолоксидазы (в образцах пластид); 2 – изоформа аскорбатоксидазы.

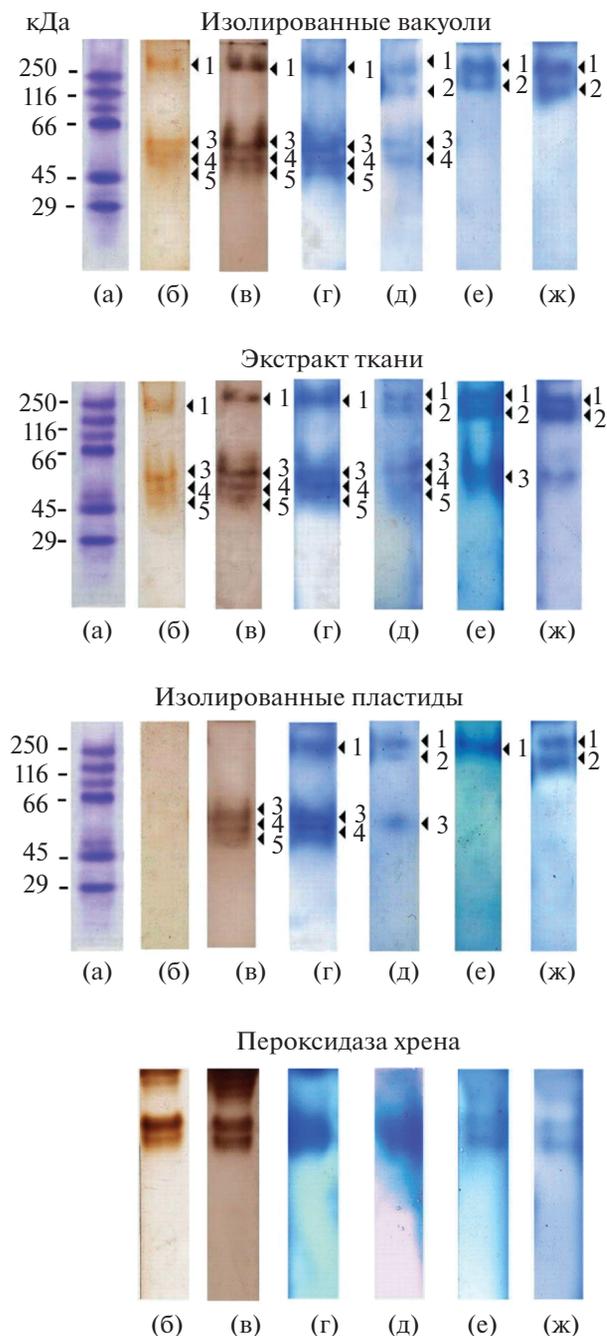
В реакционной среде с фосфатным буфером с pH 8.0 активность ПО заметно снижалась, а в области белков с низкой электрофоретической подвижностью появлялась дополнительная зона с АО-активностью (рис. 4д). Когда в эти же среды добавляли трополон, активность ПО становилась слабо различимой (рис. 6б). Хорошо просматривалась активность в дополнительной зоне. При наличии ЭДТА в реакционной среде активность ПО исчезала. АО-активность сохранялась только в дополнительной зоне (рис. 6в). DTNB не оказывала видимого эффекта (данные не приводятся).

Таким образом, в реакционных средах с фосфатным буфером в ПААГ проявлялась в основном активность ПО, которая была неспецифичной ферментативной активностью в настоящем эксперименте. Картина заметно менялась, когда использовали Трис-буфер. Известно, что буферные системы способны инактивировать некоторые ферменты [20]. В то же время, установлено, что активность АО в Трис-буфере была выше, чем в других буферных системах [20]. В средах с Трис-буфером с pH 6.0 и 8.0 активность изоформ ПО в области белков с высокой электрофоретической подвижностью не проявлялась. Однако АО-активность становилась более выраженной (особенно в средах с pH 8.0) в двух зонах в области белков с медленной электрофоретической подвижностью (рис. 4е, ж). Из двух зон одна не соответствовала зоне локализации изоформы ПО и не исчезала при наличии ЭДТА в реакционной среде (рис. 4ж, 6в). В этой зоне располагалась АО.

Поскольку активность АО в ПААГ оказалась высокой в реакционной среде с Трис-буфером с pH 8.0, то можно предположить следующую последовательность реакций:

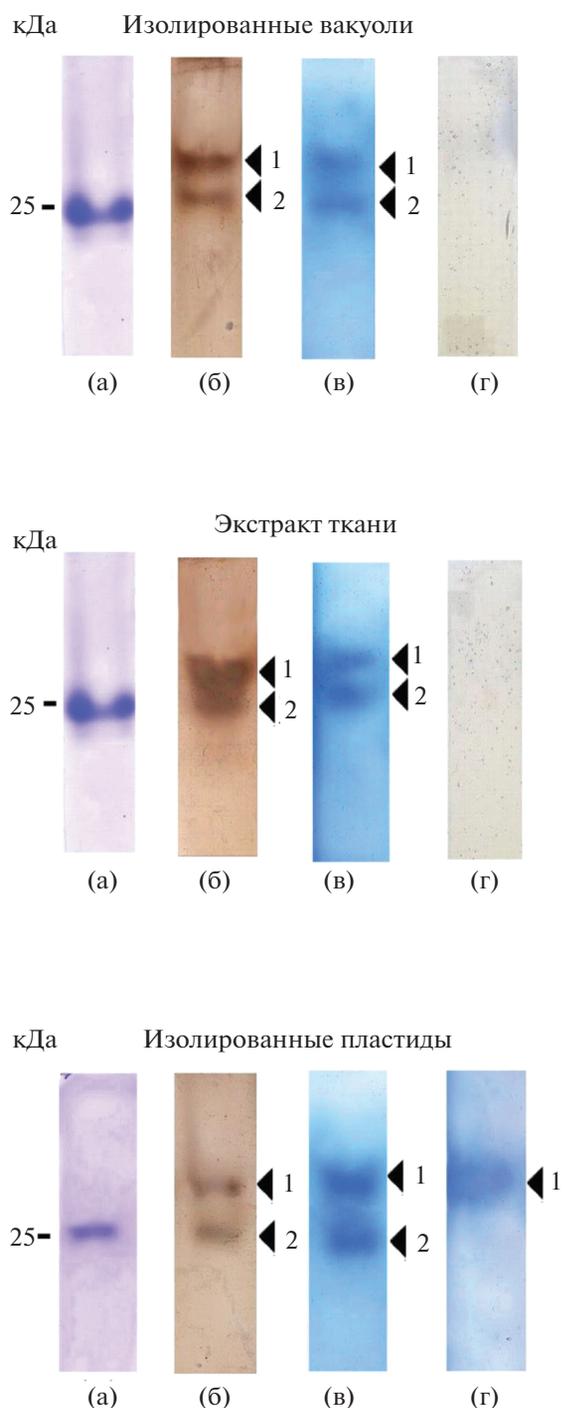


Мы допускаем, что при таком способе визуализации ферментативной активности в ПААГ суб-



стратом для АО служил восстановленный DСPIР, а не АК.

Что касается катионных белков, то в пластинах геля с положительно заряженными белками зоны с активностью АО не обнаружены (рис. 5). Так называемая АО-активность была сосредоточена только в зонах с катионными изоформами ПО (рис. 5б, г). Эти зоны появлялись, когда ПААГ инкубировали в реакционных средах с фосфатным буфером (pH 6.0), но отсутствовали, когда гели инкубировали в средах с Трис-буфером (pH 8.0) (рис. 5в).



**Рис. 5.** Ферментативная активность в ПААГ после электрофоретического разделения положительно заряженных белков: (а) – маркер трипсиноген (рI 9.3); (б) – активность пероксидазы (ПО) с DAB (в вакуолях и экстрактах ткани) и полифенолоксидазы (ПФО) с пирокатехином и PPD (в пластидах) при инкубации в реакционных средах, содержащих фосфатный буфер с рН 6.0; (в) – АО-активность с АК и DCPiP в среде с фосфатным буфером, рН 6.0; (г) – АО-активность в среде с Трис-буфером, рН 8.0. 1, 2 – изоформы ПО (у вакуолей и экстрактов ткани) и изоформы ПФО (у пластид).

**Экстракт ткани.** Расположение зон с ферментативной активностью в ПААГ у образцов вакуолей и тканевого экстракта полностью совпадало (рис. 4, 5). Эффекты трополона и ЭДТА на пероксидазную активность вакуолей и тканевого экстракта были идентичными (рис. 6б, в). Следует отметить более высокую активность ПО тканевого экстракта, которая сохранялась при инкубации ПААГ в реакционной среде с Трис-буфером с рН 6.0 (рис. 4ж). Однако она практически исчезла в Трис-буфере с рН 8.0. Вместе с тем, в этих условиях так же, как и в вакуолярных образцах, были хорошо видны две зоны в области белков с низкой электрофоретической подвижностью, в одной из которых располагалась АО (рис. 4ж, 6в).

**Пластиды.** В отличие от вакуолей и экстрактов ткани, у пластид активность с DAB не проявлялась, если пластины геля инкубировали в среде с фосфатным буфером с рН 6.0 (рис. 4б). Однако в этих условиях была видна активность анионных и катионных изоформ ПФО с субстратом пирокатехином (рис. 4в, 5б). В зонах с изоформами ПФО проявлялась активность с DCPiP и АК (рис. 4г, 5г), которую подавляли трополон и ЭДТА (рис. 6б, в). Предположительная последовательность реакций:

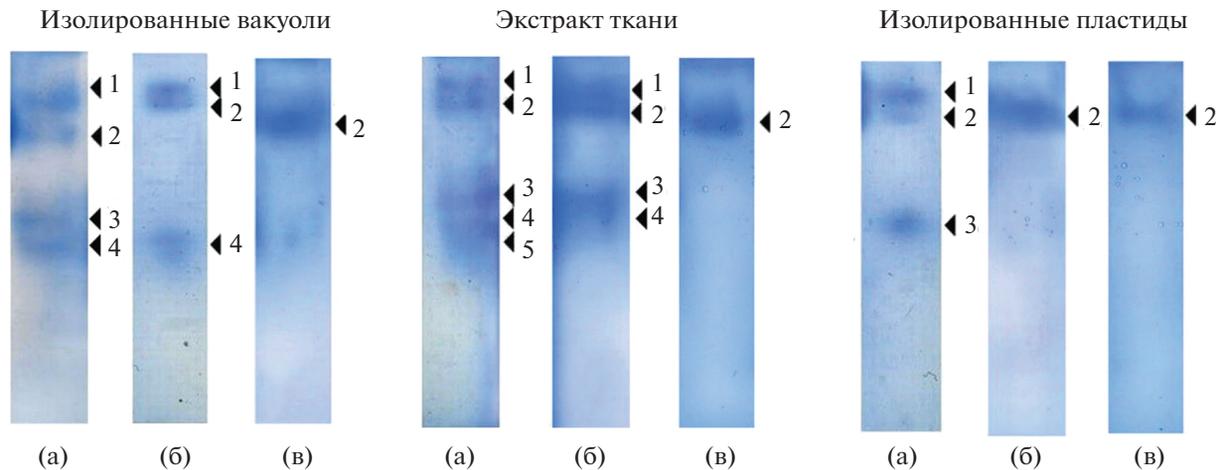


В случае с ПФО мы также допускаем окисление DCPiP (лейко-формы), а не АК.

В реакционных средах с рН 8.0 (с фосфатным буфером или Трис-буфером) в ПААГ появлялась дополнительная зона в области белков с медленной электрофоретической подвижностью (рис. 4д, ж). На ферментативную активность в этой зоне не влияли трополон и ЭДТА (рис. 6б, в), что указывало на локализацию в ней аскорбатоксидазы.

В ПААГ с положительно заряженными белками (катионными белками) дополнительные зоны с активностью АО не выявлены. Наблюдаемая активность была сосредоточена только в зонах локализации изоформ ПФО (Рис. 5б–г).

**Пероксидаза хрена.** Одновременно с анализируемыми образцами исследовали пероксидазу из корней хрена (рис. 4). Этот фермент катализировал реакции пероксидазного (с DAB) и оксидазного (с пирокатехином) окисления субстратов в реакционных средах с фосфатным буфером (с рН 6.0 и рН 8.0) (рис. 4а, б). Если инкубацию проводили в этих же реакционных средах, но при наличии АК и DCPiP, то в пластинах ПААГ также была видна активность изоформ ПО хрена (рис. 4г, д). Эта активность снижалась в реакционной среде с Трис-буфером с рН 6.0 и практически исчезала в реакционной среде с тем же буфером с рН 8.0 (рис. 4ж). Таким образом, эти результаты совпадали с результатами, полученными для ПО вакуо-



**Рис. 6.** Эффект ингибиторов на ферментативную активность в ПААГ после электрофоретического разделения отрицательно заряженных белков. Пластины геля инкубировали в реакционной среде с фосфатным буфером, pH 8.0: (а) – контрольный вариант; (б) – с трополоном; (в) – с ЭДТА. 1, 3–5 – изоформы пероксидазы (в образцах вакуолей и экстрактов ткани) или изоформы полифенолоксидазы (в образцах пластид). 2 – изоформа аскорбатоксидазы.

лей и экстрактов ткани корнеплодов столовой свеклы.

## ОБСУЖДЕНИЕ

На протяжении многих лет сохраняется высокий интерес к компартиментализации аскорбиновой кислоты в растительной клетке. Она выявлена практически во всех клеточных структурах (ядре, хлоропластах, митохондриях, пероксисомах, вакуолях, цитозоле), однако ее основная функция в них во многом неясна [3, 10]. Вакуоли и лейкопласты покоящихся корнеплодов столовой свеклы тоже содержали аскорбиновую кислоту. Величины концентраций  $AK_{\text{сум}}$  свидетельствовали о преимущественном накоплении аскорбиновой кислоты в вакуолях по сравнению с пластидами. Вместе с тем самая высокая концентрация  $AK_{\text{сум}}$  была обнаружена в водном экстракте ткани. Очевидно, в клетках корнеплодов столовой свеклы основной пул аскорбиновой кислоты сосредоточен в цитозоле. Согласно современным представлениям, местом локализации аскорбиновой кислоты в растительной клетке служит, главным образом, цитозоль [1, 3–5].

Сравнивая собственные результаты с данными из литературы, мы пришли к заключению, что на сегодняшний день нет единого мнения относительно содержания аскорбиновой кислоты в вакуолях клеток растений. Согласно данным, полученным для корней *A. rusticana*, в вакуолях может быть самое высокое содержание аскорбиновой кислоты (до 70–90% всей  $AK_{\text{сум}}$  клетки) [7]. В то же время, в протопластах *H. vulgare*, а также в клетках листьев *A. thaliana* и *Nicotina tabacum* самое высокое содержание установлено для цитозоля, а

самое низкое – у вакуолей [3, 25]. Однако у вакуолей оно в несколько раз повышалось в стрессирующих условиях. В вакуолях корней *S. maxima* аскорбиновая кислота не обнаружена [10]. В вакуолях листьев *V. faba* ее концентрация достигала 6 мкМ/мг белка [8]. В вакуолях корнеплодов столовой свеклы в нашем исследовании концентрация аскорбиновой кислоты соответствовала 5 мкМ/мг белка.

В листьях *Hordeum vulgare* содержание восстановленной формы АК в вакуолях могло достигать 15–26% от общего содержания в клетке. В этом же исследовании доля восстановленной формы АК в хлоропластах соответствовала 8–16% [25]. В другой работе концентрация АК в хлоропластах листьев *Spinacia oleracea* составляла 50% от общего содержания [26]. Лейкопласты корнеплодов столовой свеклы, согласно результатам настоящего исследования, напротив, содержали мало АК (0.3–0.4 мкМ/мг белка).

В нормальных условиях концентрация АК в компартаментах клетки намного превосходит концентрацию ДАК. Количество ДАК, как правило, составляет 10% от  $AK_{\text{сум}}$ . Однако концентрация ДАК может существенно увеличиваться вследствие усиления окислительных процессов или замедления метаболических процессов [1, 4, 27]. Результаты нашего исследования показали, что вакуоли и лейкопласты покоящихся корнеплодов столовой свеклы содержали довольно много ДАК. Величины соотношений АК/ДАК у лейкопластов (1.2 и 1.9) корнеплодов столовой свеклы были заметно ниже величин этого соотношения у хлоропластов *P. sativum* (3.9–4.2) [6]. Вероятно, у разных растительных объектов большое значение имели фазы развития и функции пластид. В отличие от растений *P. sativum*, корнеплоды свеклы

находились в фазе физиологического покоя, для которой характерна относительно низкая интенсивность жизнедеятельности, а их пластиды были представлены лейкопластами, функция которых существенно отличалась от функции хлоропластов.

Таким образом, накопление ДАК в клетках корнеплодов можно объяснить физиологическим покоем. Возможно, в фазу покоя снижалась активность дегидроаскорбатредуктаз цитозоля и замедлялось восстановление ДАК [4, 27]. Согласно современным представлениям, ДАК транспортируется из апопласта и центральной вакуоли в цитозоль, в котором происходит ее восстановление [1, 4, 25]. Целесообразность накопления ДАК в клетках корнеплода объясняли некоторые факты из литературы, которые указывали на специфическую роль аскорбиновой кислоты в росте и развитии растения. Например, АК необходима для деления клеток [27]. Если содержание АК низкое, то пролиферация клеток снижается [10]. А для быстро делящихся клеток характерно низкое внутриклеточное содержание ДАК и высокое редокс-соотношение АК/АК<sub>сум</sub> [27]. В связи с этим можно предположить, что низкое редокс-соотношение АК/АК<sub>сум</sub> у клеток корнеплодов столовой свеклы в период физиологического покоя — один из механизмов ингибирования ростовых процессов.

Направленность окислительно-восстановительных процессов в системе АК ↔ ДАК во многом зависит от активности ферментов, окисляющих АК (АО, аскорбатпероксидазы), а также ферментов, восстанавливающих МДА и ДАК (монодегидроаскорбатредуктазы и дегидроаскорбатредуктазы) [2]. Как уже отмечалось выше, все формы аскорбиновой кислоты (АК, ДАК, МДА), а также указанные аскорбат-зависимые ферменты объединены в систему аскорбиновой кислоты [1]. Некоторые элементы этой системы были выявлены в вакуолях [1, 10]. Сопоставление известных фактов и собственных результатов позволило предположить, что аккумулируемая вакуолями АК могла служить субстратом для вакуолярной АО.

Следует отметить, что сведений об АО, специфичной только для растений и грибов, не так много, как можно было бы ожидать. Этот фермент из семейства мультимедных оксидаз (из группы “голубых оксидаз”) катализирует четырехэлектронное восстановление O<sub>2</sub> [4, 28]. Примечательно, что АК — не единственный субстрат для АО, донорами восстановительных эквивалентов могли быть полифенолы и ароматические полиамины [4].

Основная биологическая функция АО, несмотря на многолетние исследования, до сих пор не установлена. Согласно одним данным, активность АО была связана с ростом растяжением [27]. Механизм, посредством которого фермент

влиял на растяжение клетки, мог быть опосредован АК, поскольку АО приписывали роль регулятора содержания АК [27]. Согласно другим данным, основная функция АО заключалась в управлении концентрациями кислорода [4, 5, 10, 27]. Некоторые факты указывали на то, что основная функция АО связана с катализом внутриклеточного синтеза воды при гиперосмотическом стрессе [4, 29]. Эта функция предполагает локализацию АО в клеточных структурах, которым необходима защита от гиперосмотического повреждения. Однако фермент выявлен, главным образом, в цитозоле и апопластном пространстве [4, 10]. Только единичные факты указывали на локализацию в хлоропластах [29], пероксисомах, Аппарате Гольджи и вакуолях [10]. Если на сегодняшний день АО из клеточных стенок и цитозоля относительно хорошо охарактеризованы [27], то АО других клеточных структур практически не изучены. Очевидно, что сравнение биохимических и физиологических характеристик ферментов разной локализации могло быть полезным для определения главной роли АО в растительном организме.

Рассматривая основные биохимические характеристики АО растений, следует отметить важное свойство АО, которое заключается в сохранении каталитической активности в довольно широком диапазоне pH 4.0–9.0 [16, 20]. Оптимумы pH для АО были обусловлены природой окисляемого субстрата, поэтому варьировали в широких пределах (от pH 4.0 до pH 8.0) [20, 23]. Для реакций окисления АК оптимальными, как правило, были слабокислые условия. Например, с АК в качестве субстрата, активность АО из плодов *C. melo* была высокой при pH 4.5–6.3, а из плодов *C. maxima* — при pH 5.5–7.0 [30]. В то же время для изоформы АО из хлоропластов *Chaetomorpha linum* были показаны оптимумы pH, которые изменялись в пределах pH 5.8–7.8 [29]. В нашем исследовании АО-активность, которую определяли с помощью спектрофотометрического метода, используя АК в качестве субстрата, была также относительно высокой в довольно широком диапазоне pH 6.0–9.0. Результаты ингибиторного анализа позволили предположить некоторый вклад в АО-активность фенольной пероксидазы в условиях с pH 9.0. В то же время у лейкопластов весомый вклад в АО-активность, особенно при pH 6.0, по всей видимости, вносила ПФО. Ранее мы установили, что для ПФО лейкопластов корнеплодов столовой свеклы оптимальными были слабокислые условия [18]. Если для АО вакуолей и тканевого экстракта pH 6.0 можно было рассматривать как оптимальный pH, то для АО пластид определить оптимальный pH не представлялось возможным из-за высокой активности ПФО в слабых условиях. В случае с пластидами нам удалось установить pH, при котором активность АО оставалась относительно высокой, по сравнению с активностью

ПФО – это рН 8.0 и 9.0. В целом, относительно высокая активность АО клеток корнеплодов столовой свеклы в широком диапазоне рН говорила о возможном эффективном функционировании фермента как в кислых условиях вакуолярного содержимого (рН 5.5–6.9), так и в нейтральных условиях стромы пластид (рН 7.3).

Аскорбатоксидаза имеет довольно сложную структуру. Активный фермент представлен димерным или тетрамерным белком, гликопротеином с молекулярной массой мономера: 64 кДа (*C. maxima*); 68 кДа (*Cucumis melo*, *Cucumis sativus*); 72 кДа (*Cucurbita pepa*) [28]. Аминокислотная последовательность субъединиц АО из разных растений высоко консервативна (до 80% идентичности). Кроме того, они обладали сигнальной последовательностью, типичной для секретируемых белков [28]. В связи с этим, фермент мог транспортироваться во внеклеточное пространство и центральную вакуоль. Так, в работе Liso с соавт. [10], иммунные метки, ассоциированные с АО, были видны как в апопластном пространстве листьев *C. maxima*, так и в вакуолях, а также в Аппарате Гольджи.

Обычно АО была представлена несколькими изоформами, количество которых варьировало в зависимости от вида растения. У *C. melo* были выявлены шесть изоформ АО, [16, 28], у *C. sativus* – три, у *N. tabacum* – одна изоформа [27]. Однако изоформ могло быть намного больше. Например, у *C. maxima* АО была представлена четырнадцатью изоформами. Изоформы АО, чаще всего, были анионными белками с *pI* 5.1–6.6. У некоторых объектов обнаруживали катионную изоформу с *pI* 8.0–8.3 [24]. В нашем исследовании активность АО выявлена в ПААГ с анионными белками (у всех анализируемых образцов). Зона со специфичной для АО активностью располагалась близко к зонам маркерных белков с молекулярной массой 116 и 205 кДа (рис. 4а). Следует отметить, что метод CN-PAGE с последующей визуализацией активности в геле позволял определить, главным образом, активность фермента, но довольно приблизительно позволял оценить количество его изоформ и их молекулярную массу.

В некоторых более ранних работах методы CN-PAGE или ИЭФ с последующей визуализацией активности в пластинах геля применялись как основные подходы для определения изоферментного состава АО [16, 28]. Количество изоформ при таком способе определения могло быть довольно большим. Наш опыт показал, что изоформы ПФО и ПО, сохраняющие активность при определенных условиях, способны демонстрировать так называемую АО-активность. В связи с этим их можно принять за изоформы АО. Очевидно, что для более точного определения количества изоформ АО необходимо использовать

разные подходы, а также тщательно подбирать буферные системы и оптимальные рН.

В заключение следует отметить, что полученные результаты продемонстрировали наличие аскорбиновой кислоты и аскорбатоксидазы в вакуолях клеток корнеплодов столовой свеклы в период физиологического покоя. Вакуоли характеризовались более высоким содержанием АК и ДАК, а также относительно высокой активностью АО по сравнению с лейкопластами. Наличие АК, ДАК и АО свидетельствовало о функционировании системы аскорбиновой кислоты в вакуолярном компартменте растительной клетки.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Davey M.W., Van Montagu M., Inze D., Sanmartin M., Kanellis A., Smirnov N., Benzie I.J.J., Strain J.J., Favell D., Fletcher J. Plant l-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing // J. Sci. Food Agric. 2000. V. 80. P. 825. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<825::AID-JSFA598>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<825::AID-JSFA598>3.0.CO;2-6)
2. Чупахина Г.Н. Система аскорбиновой кислоты растений. Калининград: Калинингр. ун-т, 1997. 120 с.
3. Zechmann B. Subcellular distribution of ascorbate in plants // Plant Signal. Behav. 2011. V. 6. P. 360. <https://doi.org/10.4161/psb.6.3.14342>
4. Akram N.A., Shafiq F., Ashraf M. Ascorbic acid – a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. P. 613. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00613>
5. Arrigoni O., De Tullio M.C. The role of ascorbic acid in cell metabolism: between gene-directed functions and unpredictable chemical reactions // J. Plant Physiol. 2000. V.157. P. 481. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(00\)80102-9](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(00)80102-9)
6. Palma J.M., Jiménez A., Sandalio L.M., Corpas F.J., Lundqvist M., Gómez M., Sevilla F., del Río L.A. Antioxidative enzymes from chloroplasts, mitochondria, and peroxisomes during leaf senescence of nodulated pea plants // J Exp Botany. 2006. V. 57. P. 1747. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj191>
7. Grob K.J., Matile P. Capillary GC of glucosinolate-derived horseradish constituents // Phytochemistry. 1980. V. 19. P. 1789. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83814-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83814-5)
8. Takahama U. Hydrogen peroxide scavenging systems in vacuoles of mesophyll cells of *Vicia faba* // Phytochemistry. 1992. V. 31. P. 1127. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)80246-B](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)80246-B)
9. Jaquinod M., Villiers F., Kieffer-Jaquinod S., Hugouvioux V., Bruley C., Garin J., Bourguignon J. A proteomics dissection of *Arabidopsis thaliana* vacuoles isolated from cell culture // Mol. Cell Proteomics. 2007. V. 6.

- P. 394.  
<https://doi.org/10.1074/mcp.M600250-MCP200>
10. Liso R., De Tullio M.C., Ciraci S., Balestrini R., La Rocca N., Bruno L., Chiappetta A., Bitonti M.B., Bonfante P., Arrigoni O. Localization of ascorbic acid, ascorbic acid oxidase, and glutathione in roots of *Cucurbita maxima* L. // J. Exp. Bot. 2004. V. 55. P. 2589.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erh262>
  11. Кузеванов В.Я., Катков Б.Б., Саляев Р.К. Общие принципы выделения вакуолей и вакуолярных мембран // Структура и функции биологических мембран растений / Под ред. Саляева Р.К., Войникова В.К. Новосибирск: Наука, 1985. С. 93.  
[http://bogard.isu.ru/articles/1985/vacuoles\\_general\\_principles\\_1985.pdf](http://bogard.isu.ru/articles/1985/vacuoles_general_principles_1985.pdf)
  12. Gaal O., Medgyesi G.A., Vereczke L. Electrophoresis in the separation of biological macromolecules. New York: Wiley. 1980. 422 p.  
<https://doi.org/10.3109/08923978009026414>
  13. Boyle S.A., Hemmingsen S.M., Dennis D.T. Uptake and processing of the precursor to the small subunit of ribulose 1.5-bisphosphate carboxylase by leucoplasts from the endosperm of developing castor oil seeds // Plant Physiol. 1986. V. 81. P. 817.  
<https://doi.org/10.1104/pp.81.3.817>
  14. Alos E., Rodrigo M.J., Zacarias L. Transcriptomic analysis of genes involved in the biosynthesis, recycling and degradation of L-ascorbic acid in pepper fruits (*Capsicum annuum* L.) // Plant Science. 2013. V. 207. P. 2.  
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.02.007>
  15. Caregnato F.F., Bortolin R.C., Divan J.A.M., Moreira C.F. Exposure to elevated ozone levels differentially affects the antioxidant capacity and the redox homeostasis of two subtropical *Phaseolus vulgaris* L. varieties // Chemosphere. 2013. V. 93. P. 320.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.084>
  16. Moser O., Kanellis A.K. Ascorbate oxidase of *Cucumis melo* L. var. *reticulatus*: purification, characterization and antibody production // J. Exp. Botany. 1994. V. 45. P. 717.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/45.6.717>
  17. Manchenko G.P. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. Second Edition. Boca Raton (Florida): CRC Press. 2002. 568 p.
  18. Прадедова Е.В., Нимаева О.Д., Трухан И.С., Саляев Р.К. Тирозиназная и супероксиддисмутазная активность пероксидазы вакуолей клеток корнеплодов столовой свеклы // Физиология растений. 2014. Т. 61. С. 77.  
<https://doi.org/10.7868/s0015330313060109>
  19. Suzuki T., Honda Y., Mukasa Y., Kim S.J. Characterization of peroxidase in buckwheat seed // Phytochemistry. 2006. V. 67. P. 219.  
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.11.014>
  20. Gerwin B., Burstein S.R., Westley J. Ascorbate Oxidase. Inhibition, activation, and pH effects // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. P. 2005.
  21. Kim Y.J., Uyama H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future // Cell. Mol. Life Sci. 2005. V. 62. P. 1707.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-005-5054-y>
  22. Murata K., Sugihara M., Nakamura N., Ohno H. Ascorbate oxidase-catalyzed electrochemical reduction of dioxygen using 2,6-dichloroindophenol as an electron-transfer mediator // Chem. Lett. 2006. V. 35. P. 1232.  
<https://doi.org/10.1246/cl.2006.1232>
  23. Sugino M., Kajita S., Banno K., Shirai T., Yamane T., Kato M., Kobayashi T., Tsukagoshi N. Upward shift of the pH optimum of Acremonium ascorbate oxidase // Biochim. Biophys. Acta. 2002. V. 1596. P. 36.  
[https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(01\)00310-7](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(01)00310-7)
  24. Sekiya J., Hamade R., Kimura O., Mizuno K., Shimose N. Purification and properties of ascorbate oxidase from cucumber fruit // Soil Sci. Plant Nutr. 1990. V. 36. P. 1.  
<https://doi.org/10.1080/00380768.1990.10415704>
  25. Rautenkranz A.A.F., Li L., Machler F., Martinoia E., Oertli J.J. Transport of ascorbic and dehydroascorbic acid across protoplasts and vacuole membranes isolated from barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Gerbel) leaves // Plant Physiol. 1994. V. 106. P. 187.  
<https://doi.org/10.1104/pp.106.1.187>
  26. Luwe M.W.F., Takahama U., Heber U. Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L) leaves // Plant Physiol. 1993. V. 101. P. 969.  
<https://doi.org/10.1104/pp.101.3.969>
  27. Pignocchi C., Fletcher J.M., Wilkinson J. E., Barnes J. D., Foyer C.H. The function of ascorbate oxidase in tobacco // Plant Physiol. 2003. V. 132. P. 1631.  
<https://doi.org/10.1104/pp.103.022798>
  28. Al-Madhoun A.S., Sanmartin M., Kanellis A.K. Expression of ascorbate oxidase isoenzymes in cucurbits and during development and ripening of melon fruit // Postharvest Biol. Tec. 2003. V. 27. P. 137.  
[https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(02\)00090-X](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00090-X)
  29. Caputo E., Ceglie V., Lippolis M., La Rocca N., De Tullio M.C. Identification of a NaCl-induced ascorbate oxidase activity in *Chaetomorpha linum* suggests a novel mechanism of adaptation to increased salinity // Environ. Exp. Bot. 2010. V. 69. P. 63.  
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.02.008>
  30. Carvalho J. L.B., Lima C.J., Medeiros P.H. Ascorbate-oxidase from *Cucurbita maxima* // Phytochemistry. 1981. V. 20. P. 2423.  
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82680-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82680-1)

## ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА С И ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ГДФ-L-ГАЛАКТОЗОФОСФОРИЛАЗЫ (*VTC2*) У СОРТОВ ЛУКА-ПОРЕЯ (*Allium porrum* L.)

© 2021 г. О. К. Анисимова<sup>а</sup>, Т. М. Середин<sup>б</sup>, А. В. Щенникова<sup>а</sup>,  
Е. З. Кочиева<sup>а</sup>, М. А. Филюшин<sup>а, \*</sup>

<sup>а</sup>Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”  
Российской академии наук, 119071, Москва, Россия

<sup>б</sup>Федеральный научный центр овощеводства, 143080, п. ВНИИССОК, Россия

\*e-mail: michel7753@mail

Поступила в редакцию 24.04.2020 г.

После доработки 14.05.2020 г.

Принята к публикации 14.05.2020 г.

У четырех сортов лука-порея (*Allium porrum* L.) определена последовательность кДНК гомологов гена *VTC2*, кодирующего ГДФ-L-галактозофосфоорилазу — ключевой фермент L-галактозного пути биосинтеза аскорбиновой кислоты (АК). Определена вариабельность кДНК *VTC2* и кодируемых ими ферментов у анализируемых сортов. Определены профили экспрессии гена *VTC2* в корнях, донце, белой части и в листьях каждого сорта в период активного роста (август), сбора урожая (октябрь) и через два месяца хранения (декабрь). Обнаружено, что в корнях ген *VTC2* экспрессируется сходным образом у всех исследуемых сортов, при этом максимальный уровень транскрипции приходится на октябрь. После двух месяцев хранения в анализируемых тканях лука-порея наблюдалось снижение уровней транскрипции *VTC2*. Было определено содержание АК в тканях сортов, которое положительно коррелировало с уровнем экспрессии *VTC2* в зеленых листьях ( $r = 0.34$ ), тогда как в белой части растений корреляция была отрицательной ( $r = -0.58$ ). В ответ на холодовой стресс (+4°C) изменение уровня транскрипции *VTC2* в зеленых листьях лука-порея наблюдалось только через 6 ч инкубации. В зеленых листьях лука-порея уровни экспрессии *VTC2* и содержание АК через 24 ч были сопоставимы с исходными (0 ч) значениями и в нормальных условиях, и в ответ на холодовой стресс.

**Ключевые слова:** *Allium porrum*, лук-порея, содержание витамина С, ГДФ-L-галактозофосфоорилаза, *VTC2*, профиль экспрессии, холодовой стресс

**DOI:** 10.31857/S0015330320060020

### ВВЕДЕНИЕ

В процессе фотосинтеза, фотодыхания, а также при воздействии различных стрессовых факторов, таких как избыток ультрафиолетового излучения, засуха, экстремальные температуры, атаки патогенов и др., в клетках растений образуются активные формы кислорода (АФК), способные окислять компоненты мембран, приводить к деградации нуклеиновых кислот, белков и пигментов, что, в конечном итоге, вызывает гибель клеток [1]. Для предотвращения накопления АФК и минимизирования негативных последствий их перепроизводства, растительные клетки выработали сложную антиоксидантную систему. К ферментативной антиоксидантной системе относятся такие ферменты как супероксиддисмутаза (SOD; EC 1.15.1.1), каталаза (CAT;

EC 1.11.1.6), глутатионредуктаза (GR; EC 1.6.4.2), аскорбатпероксидаза (APX; EC 1.11.1.11), монодегидроаскорбатредуктаза (MDHAR; EC 1.8.5.1) и дегидроаскорбатредуктаза (DHAR; EC 1.8.5.1) [1, 2]. К неферментативной антиоксидантной системе относятся каротиноиды, антоцианы, некоторые полифенолы, глутатион, а также витамины —  $\alpha$ -токоферол (витамин Е) и L-аскорбиновая кислота (АК, витамин С) [2]. Указанные антиоксиданты обнаружены почти во всех клеточных компартментах, что подчеркивает важность детоксикации АФК для выживания клеток [1].

L-аскорбиновая кислота — один из самых распространенных водорастворимых антиоксидантов растительных клеток. Помимо антиоксидантной функции, АК вовлечена в процессы клеточного роста и деления, а также является субстратом для синтеза других соединений и кофактором неко-

торых ферментов, вовлеченных, например, в пути биосинтеза каротиноидов и антоцианов [3, 4]. Несмотря на важность и разнообразие выполняемых функций, метаболические пути АК до недавнего времени оставались неизученными, а некоторые ферменты промежуточных этапов биосинтеза не определены до сих пор [4]. К настоящему времени описаны четыре основных пути биосинтеза АК — L-галактозный, L-гулозный, галактуроновый и мио-инозитоловый [4, 5]. L-галактозный путь (путь Смирнова-Уилера) считается доминирующим у растений [4]. Для этого пути определены все ферментативные стадии — в результате восьми последовательных реакций из D-фруктозы-6-Ф образуется L-аскорбиновая кислота [4, 6].

Ключевым ферментом L-галактозного пути является ГДФ-L-галактозофосфорилаза (ЕС 2.7.7.69), катализирующая превращения ГДФ-L-галактозы в L-галактоза-1-фосфат, который является первым соединением на пути биосинтеза АК [4, 7]. Для многих видов растений было показано, что увеличение экспрессии гена ГДФ-L-галактозофосфорилазы приводит к повышению АК в 1.4–6.0 раз, что сделало данный ген одной из мишеней в стратегиях по увеличению содержания АК в растениях [6]. Также, была выявлена положительная связь между увеличением экспрессии гена ГДФ-L-галактозофосфорилазы и толерантностью растения к абиотическим стрессам [8].

К настоящему времени последовательности генов, кодирующих ГДФ-L-галактозофосфорилазу, идентифицированы у многих видов растений. При этом геном некоторых растений, например, *Arabidopsis thaliana*, содержит два паралогиальных гена *VITAMIN C (VTC) 2* и *VTC5*, кодирующие изоформы данного фермента, которые совместно регулируют L-галактозный путь [9]. Было показано, что оба гена *VTC2* и *VTC5* экспрессируются в листьях, стеблях, корнях, цветках и стручках *A. thaliana*, однако уровень транскрипции *VTC2* на 2–3 порядка выше, чем *VTC5*. Более того, содержание L-аскорбата в листьях растений с выключенной транскрипцией *VTC5* не отличалось от такового у растений дикого типа [9]. Интересно также, что в ответ на окислительный стресс в клетках водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* повышался уровень мРНК именно *VTC2*, что сопровождалось синтезом и накоплением L-аскорбата [10]. Очевидно, что из двух паралогов главная роль принадлежит *VTC2*, а *VTC5*, по-видимому, имеет вспомогательную функцию.

Среди овощных культур с высоким содержанием витамина С важное место занимают луковые культуры, в том числе, лук-порей (*Allium porrum* L.). Количество АК в зеленых листьях этого растения может достигать 8.5 мг/г сухой массы [11]. Отбеленная часть ложного стебля лука-порея (употребляемой в пищу) содержит значительно меньше ви-

тамина С, чем зеленые листья [11]. Несмотря на то, что лук-порей является перспективным объектом для селекции сортов с повышенным содержанием витамина С, ни у лука-порея, ни у других видов *Allium*, гены биосинтеза аскорбиновой кислоты до сих пор не идентифицированы и не изучены.

Целью данной работы стала идентификация гена ГДФ-L-галактозофосфорилазы (*VTC2*) у лука-порея, определение профиля его экспрессии в различных частях растения в процессе вегетации и хранения, а также в ответ на холодостресс и дневное освещение, и оценка возможной корреляции уровня транскрипции *VTC2* и содержания витамина С в зеленых листьях и отбеленной части ложного стебля лука-порея.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения работы были использованы четыре сорта лука-порея — Blauwgroene winter, Колабус, Otina и Pandora. Растения были выращены в коллекционном питомнике Федерального научного центра овощеводства (ФНЦО). Для работы использовали растения, соответствующие трем временным точкам — август (активный рост), октябрь (уборка урожая) и декабрь (после двухмесячного периода хранения в овощехранилище при температуре 2°C и влажности 70%, без освещения). Собирали и замораживали (–80°C) образцы тканей корней, донца (видоизмененный стебель), листьев (фрагменты взрослых листьев в 10 см от белой части) и белой части (поперечный срез шириной 0.5 см отбеленного ложного стебля в 2 см от донца). Из данных образцов выделяли суммарную РНК, которую дополнительно очищали от примесей ДНК (наборы RNeasy Plant Mini Kit и RNase free DNasey set; “QIAGEN”, Германия) и использовали для синтеза кДНК (набор GoScript™ Reverse Transcription System; “Promega”, США).

С целью разработки праймеров для амплификации гомологов гена *VTC2* у лука-порея проводили поиск последовательностей, гомологичных *VTC2*, у видов *Allium* в базе транскриптомных данных NCBI\_TSA (Transcriptome Shotgun Assembly) с помощью BLAST-N (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). На основе выявленных транскриптов разрабатывали специфичные праймеры. Данные праймеры и препараты кДНК использовали для амплификации полноразмерных кодирующих последовательностей гомологов гена *VTC2* у образцов *A. porrum* L. ПЦР-продукты ожидаемой длины очищали с помощью QIAEX® II Gel Extraction kit (“QIAGEN”, Германия) и секвенировали с использованием тех же праймеров на ABI Prism 3700 DNA Analyzer (“Applied Biosystems”, США). Анализ и выравнивание полученных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы MEGA 7.0 (<https://>

www.megasoftware.net/). Консервативные домены и мотивы в белках определяли с помощью программ NCBI-CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). Влияние аминокислотных замен на структуру и функции белков предсказывали с помощью программы PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/index.php>).

Пространственно-временной профиль экспрессии гена *VTC2* в корнях, донце, листьях и белой части исследуемых сортов лука-порея определяли методом ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР). На основе транскриптов, гомологичных *VTC2*, выявленных у видов *Allium*, разрабатывали специфичные праймеры для проведения РВ-ПЦР. Относительный уровень экспрессии *VTC2* определяли по референсным генам *GAPDH* [12] и *UBQ* [13]. Для проведения РВ-ПЦР использовали набор “Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR Green I и ROX” (ООО “Синтол”, Россия) и амплификатор CFX96 Real-Time PCR Detection System (“Bio-Rad Laboratories”, США). В качестве матрицы использовали препарат кДНК каждого образца в количестве 3 нг. Реакции проводили в двух биологических и трех технических повторах в следующих условиях: 95°C – 5 мин; 40 циклов (95°C – 15 с, 62°C – 50 с).

Для определения содержания АК использовали набор “L-Ascorbic acid” (“R-Biopharm AG”, Германия). Статистическую обработку результатов РВ-ПЦР и биохимического анализа проводили с помощью программы GraphPad Prism v. 8 (<https://www.graphpad.com>).

Для симуляции холодового стресса, 60-дневные растения лука-порея сорта Коламбус помещали в климатическую камеру с регулируемыми условиями (день/ночь – 16/8 ч, 22/16°C, освещенность 190 ммоль/(м<sup>2</sup> с)). Через 14 дней после такой инкубации собирали листовую материал (контрольная группа, в двух технических повторах) в четырех временных точках (0 – за 15 минут до включения света, затем через 2, 4, 6 и 24 часа). На следующий день за 15 минут до включения света в климатической камере меняли температуру (условия: день/ночь – 16/8 ч, температура 4°C, освещенность 190 ммоль/(м<sup>2</sup> с)). Ткани листьев (в двух технических повторах) подвергнутых стрессу растений отбирали через те же временные интервалы, что и образцы контрольной группы. При этом проба (0 ч) непосредственно отбиралась перед включением низкотемпературного режима. Собраный листовый материал использовали для выделения препаратов суммарной РНК (с последующим синтезом кДНК), исследования профиля экспрессии гена *VTC2* (РВ-ПЦР) и биохимического анализа (определение содержания АК; протоколы см. выше).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

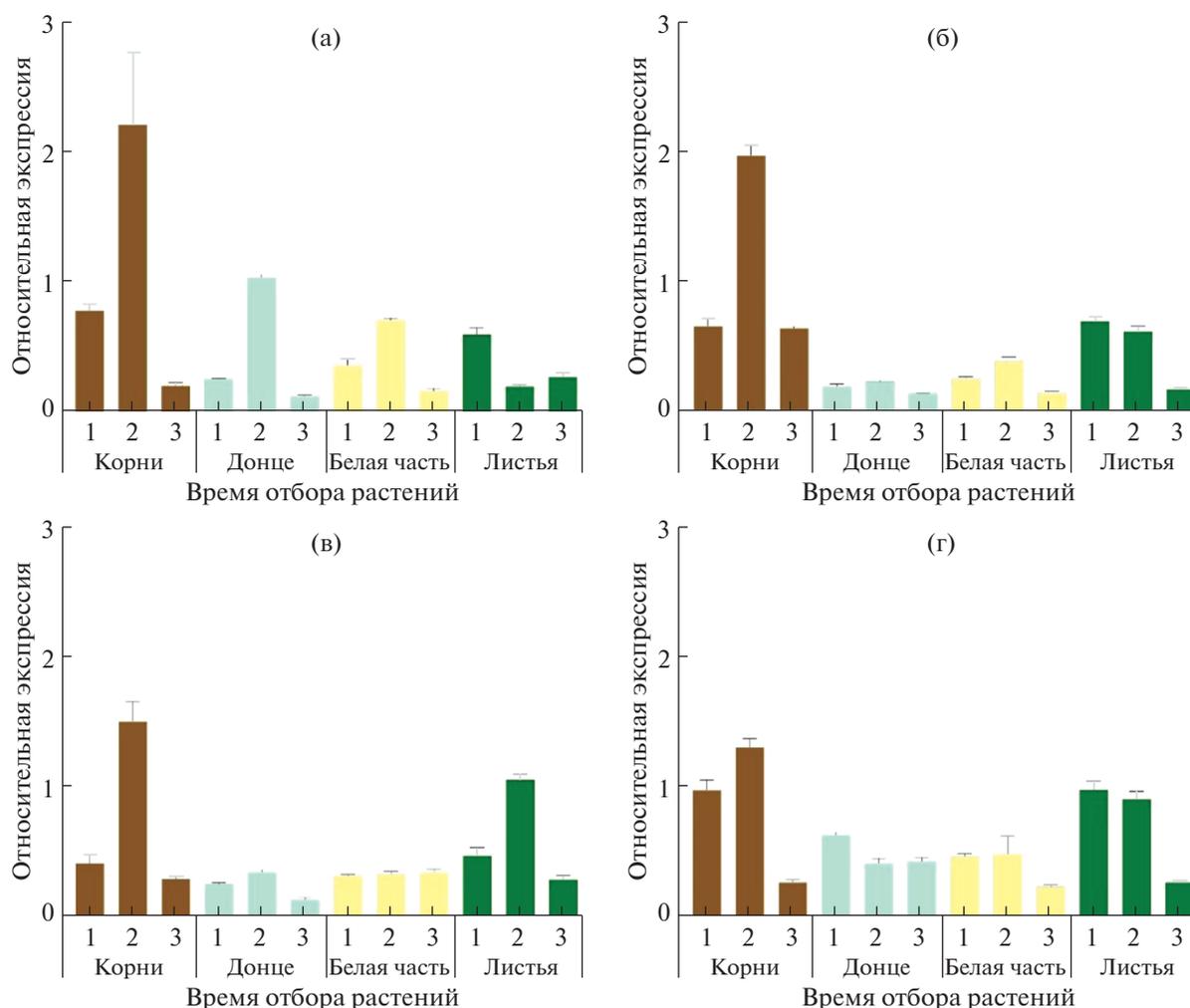
Для исследования были отобраны четыре сорта лука-порея – Blauwgroene winter, Коламбус, Otina и Pandora, которые по предварительным измерениям различались содержанием АК в белой части растений (44, 46, 31 и 59 мг/100 г сырой массы, соответственно), а также морфологией ложного стебля – тонкий у первых двух сортов (2–4 см), мощный и толстый (5–7 см) у двух последних.

Так как в базе данных NCBI отсутствуют какие-либо аннотированные у видов *Allium* последовательности, гомологичные *VTC2*, то с целью разработки праймеров для амплификации данного гена у лука-порея был проведен поиск гомологов *VTC2 Asparagus officinalis* (XM\_020388507.1; ближайший родственник вид, геном которого полностью секвенирован и аннотирован) в базе транскриптомных данных (NCBI\_TSA). Были выявлены гомологичные *VTC2* транскрипты у видов *Allium* (*A. ampeloprasum* L. (GFAR01020967.1), *A. cepa* L. (GBGJ01076064.1) и *A. sativum* L. (GFAP01091649.1)). На основе их последовательностей были разработаны специфичные праймеры ApVTC2F (5'-GTTCTCCTTCCGATTTGCT-3') и ApVTC2R (5'-ATTCCATARATACTGACTTCAG-3'). С их помощью были амплифицированы и секвенированы последовательности гомологов гена *VTC2* анализируемых в работе сортов лука-порея. Для определения методом РВ-ПЦР уровней транскрипции гомолога гена *VTC2* в различных органах лука-порея были разработаны специфичные праймеры rVTC2F (5'-GGTGTCAAGCGTGTGTATCTG-3') и rVTC2R (5'-TTCCCAAACAGCGGGATTGAC-3').

Длина полноразмерной кодирующей последовательности гомологов *VTC2* у всех четырех анализируемых образцов лука-порея была инвариантна и составила 1275 п.н. Анализ варибельности последовательностей гомологов *VTC2* (в сравнении с *VTC2 A. ampeloprasum*) выявил 15 нуклеотидных замен (SNPs), наибольшее количество замен было идентифицировано у сорта Otina (10 SNPs).

Полученные нуклеотидные последовательности были транслированы. Сравнение полученных белков с последовательностями базы данных NCBI подтвердило их структурную гомологию с ферментом ГДФ-Л-галактозофосфорилазой. Размер белка у всех исследуемых сортов лука-порея был инвариантен и составил 424 а.о. С помощью NCBI-CDD в последовательностях анализируемых белков *VTC2* был выявлен консервативный домен ГДФ-Л-галактозогексо-1-фосфат-гуанилтрансферазы (PLN03103) в положении 1–393 а.о. Также, в анализируемых последовательностях белков был идентифицирован консервативный мотив HLNHFQ (233–237 а.о.), являющийся каталитическим центром ГДФ-Л-галактозофосфорилазы.

Обнаруженные в кДНК нуклеотидные замены приводили к пяти замещениям а.о. (P37A, S56C,



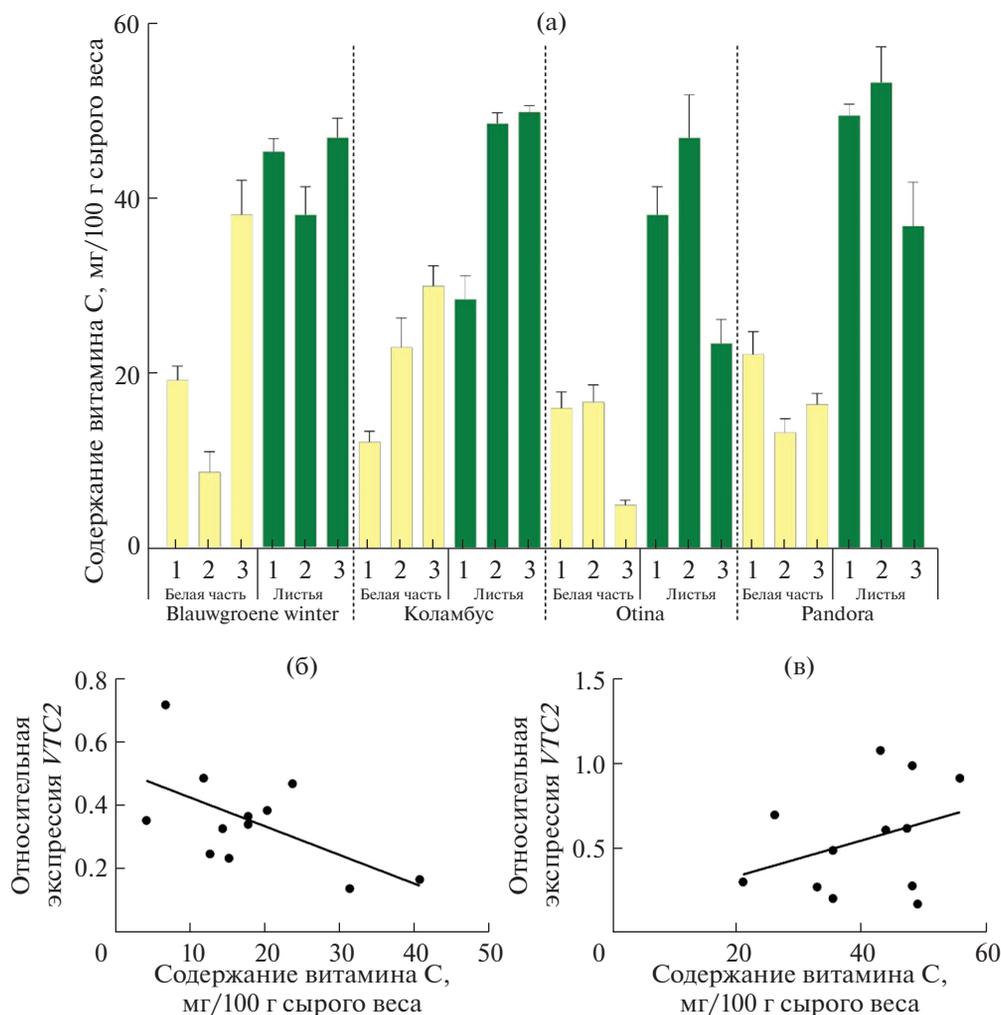
**Рис. 1.** Профиль экспрессии гена *VTC2* в корнях, донце, белой части и зеленых листьях четырех сортов лука-порей (а – Blauwgroene winter, б – Коломбус, в – Otina, г – Pandora). 1 – август (активный рост), 2 – октябрь (сбор урожая), 3 – декабрь (через два месяца хранения).

A365P, R406S, A417S). Последовательности *VTC2* у сортов Blauwgroene winter и Pandora были идентичны, тогда как *VTC2* сортов Otina и Коломбус содержали одно (P37A) и четыре (S56C, A365P, R406S, A417S) замещения, соответственно. Анализ всех обнаруженных замещений в программе PROVEAN предсказал их нейтральный характер, что может свидетельствовать о консервативности каталитической функции идентифицированных ферментов *VTC2* у сортов лука-порей.

Методом РВ-ПЦР был определен профиль экспрессии гена *VTC2* в корнях, донце, белой части и листьях растений в фазе активного роста (август), сбора урожая (октябрь) и через два месяца хранения (декабрь) (рис. 1). Экспрессия гена *VTC2* была выявлена во всех анализируемых органах сортов лука-порей. Для исследуемых сортов был характерен схожий профиль экспрессии *VTC2* в корнях с максимумом в растениях, собранных в

октябре (рис. 1). Уровни экспрессии *VTC2* в корнях в августе (точка 1) и декабре (точка 3) были сопоставимы (сорта Коломбус и Otina) или значительно снижались в декабре (сорта Blauwgroene winter и Pandora).

Во всех остальных исследуемых органах сортов лука-порей какого-либо заметного, системного сходства профиля экспрессии гена *VTC2* не наблюдалось (рис. 1). Так, в донце *VTC2* экспрессировался сходным образом у сортов Blauwgroene winter, Коломбус и Otina, при этом уровни транскрипции значительно варьировали (рис. 1). В белой части сходный профиль экспрессии был выявлен у сортов Blauwgroene winter и Коломбус, а у сорта Otina уровень транскрипции *VTC2* был одинаков во всех трех временных точках (рис. 1). В зеленых листьях лука-порей схожий профиль (снижение от точки 1 к точке 3) экспрессии *VTC2* наблюдался у сортов Коломбус и Pandora. Инте-



**Рис. 2.** Содержание АК в белой части и зеленых листьях растений четырех сортов лука-порей (1 – август (активный рост), 2 – октябрь (сбор урожая), 3 – декабрь (через два месяца хранения)) (а); линейная регрессия уровней транскрипции гена *VTC2* и содержания АК в белой части (б) и зеленых листьях (в) растений лука-порей четырех анализируемых сортов.

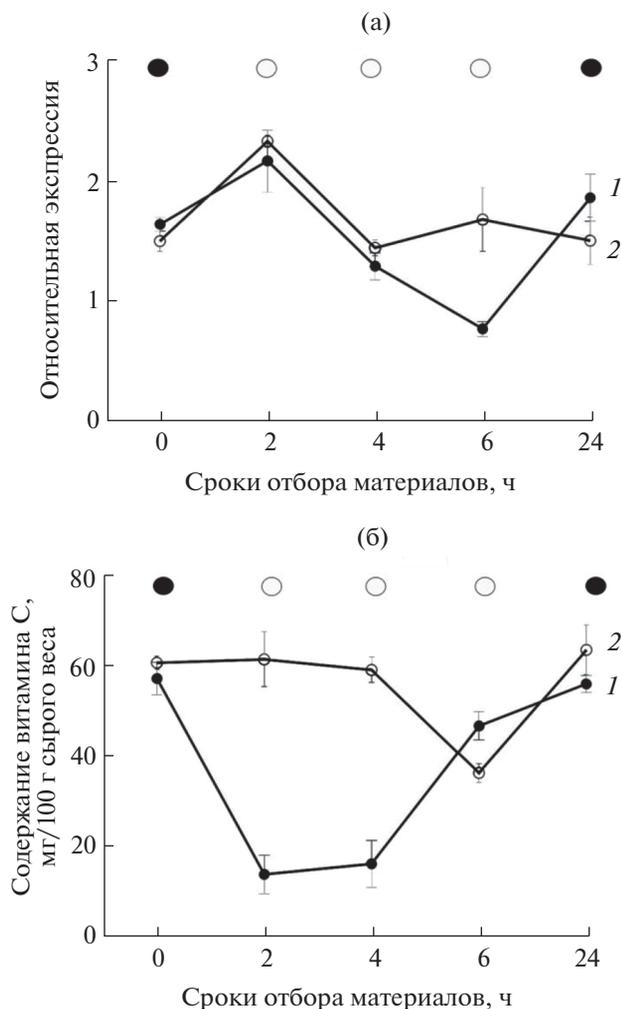
ресно отметить, что у растений лука-порей, собранных в августе, уровни экспрессии в корнях и зеленых листьях были примерно на одном уровне.

Для поиска возможных корреляций между уровнями транскрипции гена *VTC2* и содержанием АК у анализируемых четырех сортов лука-порей, в белой части и зеленых листьях (в трех временных точках) было определено содержание витамина С (рис. 2а). В зеленых листьях всех четырех исследуемых сортов лука-порей содержание АК было выше, чем в белой части растений. Если сравнивать значения содержания АК в период сбора урожая (октябрь), то в зеленых листьях содержание АК было выше в 2.1–4.5 раза и достигало 52.8 мг/100 г сырой массы (сорт Pandora).

Динамика содержания АК в белой части и зеленых листьях у анализируемых сортов лука-порей значительно отличалась (рис. 2а). В белой части

растений сорта Blauwgroene winter наблюдался рост содержания АК от августа к декабрю – в 2 (август vs. декабрь) и 4.5 (октябрь vs. декабрь) раза. При этом в зеленых листьях этого сорта содержание АК в трех анализируемых точках не имело достоверных различий. У сорта Коломбус и белая часть, и зеленые листья характеризовались ростом содержания АК в 2.5 и 1.7 раза (август vs. декабрь), соответственно. При этом в период с октября по декабрь содержание АК в зеленых листьях этих сортов, а также в белой части сорта Коломбус почти не менялось. В случае двух других сортов, Otina и Pandora, после двух месяцев хранения содержание АК снижалось в зеленых листьях (оба сорта) и в белой части (Otina) и оставалось постоянным в белой части образца сорта Pandora (рис. 2а).

Полученные значения содержания АК в белой части и зеленых листьях растений лука-порей бы-



**Рис. 3.** Уровни экспрессии гена *VTC2* (а) и содержание АК (б) в зеленых листьях лука-порея сорта Коламбус при нормальных условиях выращивания (контроль) и при холодном стрессе. Листовой материал отбирался через 0, 2, 4, 6 и 24 часа (ось абсцисс). 1 – контроль; 2 – холодного стресса. Над графиками схематично указан световой режим в момент отбора листьев для анализа (черный круг – режим “ночь”; белый круг – режим “день”).

ли сопоставлены с уровнями транскрипции гена *VTC2* (рис. 2б, в). В белой части растений была выявлена отрицательная корреляция ( $r = -0.58$ ) между содержанием АК и уровнями транскрипции *VTC2* (рис. 3б). В зеленых листьях уровни экспрессии *VTC2* положительно коррелировали ( $r = 0.34$ ) с содержанием АК (рис. 2в).

Для оценки влияния холодного стресса на уровни транскрипции гена *VTC2* в зеленых листьях 60-дневных растений лука-порея (сорт Коламбус) были определены уровни экспрессии гена *VTC2* (рис. 3а) и содержание АК (рис. 3б), при нормальных условиях выращивания (контроль) и при холодном стрессе ( $+4^{\circ}\text{C}$ ). При нормальных

условиях выращивания через 2 ч после включения освещения в зеленых листьях лука-порея наблюдался максимальный уровень транскрипции *VTC2*, затем он снижался и через 6 ч достигал минимального значения (снижение в 2.1 раза по сравнению с начальным уровнем). В следующей временной точке (24 ч) уровень экспрессии *VTC2* был сопоставим с исходным значением (0 ч).

В зеленых листьях, подвергнутых холодному стрессу, уровни экспрессии *VTC2* в первых трех временных точках (0, 2 и 4 ч) были сопоставимы с контролем (рис. 3а). В точке (2 ч) произошел резкий рост экспрессии *VTC2*, в том числе, в ответ на включение освещения. Через 6 ч (режим “день”) низкотемпературного воздействия уровень транскрипции *VTC2* резко вырос в сравнении с контролем, а через 24 ч снова с ним сравнялся и оказался близок к исходному (0 ч) значению (рис. 3а).

Изменение содержания АК в зеленых листьях лука-порея при нормальных условиях выращивания и в ответ на холодный стресс показано на рис. 3б. При нормальных условиях выращивания (контроль) максимальное содержание АК было выявлено в листьях при отсутствии освещения (режим “ночь”). Через 2 часа после включения света содержание АК в листьях значительно (в 3 раза) снижалось, однако затем начинало расти и через 24 ч достигало исходного уровня (рис. 3б).

Динамика содержания АК в зеленых листьях лука-порея при холодном стрессе значительно отличалась от контроля (рис. 3б). В течение, как минимум, первых 4 ч стресса содержание АК оставалось неизменным, а через 6 ч – снижалось в 1.7 раза по сравнению с уровнем (0 ч). Однако через 24 ч низкотемпературного воздействия, аналогично контролю, содержание АК в зеленых листьях возвращалось к исходному (0 ч) уровню.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Чрезмерное образование АФК в растении приводит к окислительному стрессу, и АК является одним из наиболее важных низкомолекулярных неферментативных соединений, участвующих в антиоксидантной защите растения [2]. Пути биосинтеза аскорбиновой кислоты достаточно хорошо охарактеризованы для некоторых видов растений [4, 7]. Однако список этих растений не включает виды *Allium* (в том числе *Allium porrum*, лук-порея), которые являются одним из источников витамина С в диете человека.

Основной для растений L-галактозный путь биосинтеза АК находится под контролем ГДФ-L-галактозофосфориллазы, кодируемой геном *VTC2* [9]. В настоящей работе впервые были идентифицированы гомологи этого гена у четырех сортов лука-порея, различающихся по содержанию АК. Была определена вариабельность гомологов *VTC2*

и паттерн их экспрессии в динамике развития растений и в ответ на низкие температуры, а также проведена оценка возможных корреляций между уровнем экспрессии и содержанием АК.

Была показана высокая консервативность изучаемых гомологов и подтверждена их принадлежность к суперсемейству белков HINT (histidine triad nucleotide protein) [14]. Характерный домен PLN03103 присутствовал у всех идентифицированных ферментов, включая каталитический центр, инвариантный для *VTC2* не только сортов лука-порея, но и *A. thaliana*, *Solanum lycopersicum* и других видов растений [14, 15].

В большинстве исследований при анализе генов биосинтеза витамина С акцент делается либо на плодах, либо на листьях [16–19]. Нами был проведен анализ профиля экспрессии *VTC2* во всех частях растения лука-порея: корнях, донце, белой части и листьях в динамике их развития и хранения – на стадии активного роста (август), во время сбора урожая (октябрь) и спустя два месяца хранения (декабрь). За исключением корней, в исследуемых органах анализируемых сортов какого-либо заметного, системного сходства профиля экспрессии гена *VTC2* не наблюдалось (рис. 1).

В корнях был выявлен довольно высокий уровень экспрессии *VTC2* (особенно на стадии сбора урожая), сходный для всех анализируемых сортов лука-порея. При этом уровень экспрессии гена в 1.4–10.6 раз превосходил таковой в зеленых листьях (рис. 1). Особенно значимая разница наблюдалась у сортов *Blauwgroene winter* и *Коламбус*: в октябре уровень экспрессии *VTC2* в корнях в 10.6 и 3.2 раза, соответственно, превысил уровень экспрессии в зеленых листьях. В целом, сравнивая уровни транскрипции *VTC2* в растениях лука-порея после уборки (октябрь) и после двух месяцев в овощехранилище (декабрь), можно говорить о снижении экспрессии *VTC2* во всех органах (за исключением белой части сорта *Otina* и донца сорта *Pandora*) анализируемых сортов в процессе хранения.

Динамика содержания АК в белой части и зеленых листьях у анализируемых сортов лука-порея значительно различалась (рис. 2а). В целом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что в процессе послеуборочного хранения лука-порея значительного снижения содержания АК не происходит (за исключением сорта *Otina*), как это было показано для шпината и других листовых овощных культур [17]. Подобная динамика наблюдалась и в клубнях картофеля в процессе хранения [20].

Сопоставление уровня транскрипции *VTC2* с содержанием АК в разных тканях лука-порея выявило положительную корреляцию в зеленых листьях и отрицательную в белой части растений. Полученные нами результаты находятся в соответствии с известными данными. Так, положитель-

ная корреляция между уровнями транскрипции гена *VTC2* и содержанием АК наблюдается в фотосинтезирующих тканях проростков кукурузы [19]. В незрелых (фотосинтезирующих) плодах барбадосской вишни (*Malpighia emarginata*) высокое содержание АК сопровождается высокой экспрессией гена *VTC2* и некоторых других структурных генов L-галактозного пути [18, 21]. Напротив, в нефотосинтезирующих тканях, таких как, например, сочные зрелые плоды шиповника (*Rosa roxburghii*), корреляция между содержанием АК и экспрессией *VTC2* отрицательная [16]. Помимо статуса ткани (фотосинтезирующая/нефотосинтезирующая) и уровня экспрессии *VTC2*, на содержание АК может оказывать влияние экспрессия других структурных генов L-галактозного пути, альтернативные пути биосинтеза АК, активность ферментов деградации и рециклинга, а также особенности межклеточного транспорта АК [18, 22].

Температурные стрессы являются одними из наиболее важных факторов, влияющих на продуктивность и географическое распределение растений. Было показано, что уровень транскрипции гена *VTC2* и содержание АК изменяются в ответ на температурный стресс, изменения освещенности и другие абиотические стрессы [23–25]. Лук-порея является двухлетней культурой, наибольший вред для посевов в первый год вегетации представляют низкие температуры (заморозки).

В настоящем исследовании было проведено сравнение суточного (день/ночь, 16/8 ч) изменения экспрессии *VTC2* в нормальных условиях и в ответ на холодовой стресс. Было показано, что в обоих случаях уровни транскрипции *VTC2* были схожи, за исключением точки 6 ч после включения освещения (рис. 3а). По-видимому, активация транскрипции *VTC2* в ответ на начало освещения может быть связана с наличием в промоторе светочувствительных *cis*-элементов [25], которые были идентифицированы также в промоторах некоторых других генов L-галактозного пути биосинтеза АК [26]. Однако рост экспрессии *VTC2* в ответ на повышение освещенности наблюдается не у всех растений. Так, в проростках кукурузы уровень освещения не оказывал влияния на экспрессию *VTC2*, но значительное изменение уровня транскрипции в ответ на свет было выявлено для гена рециклинга АК – дегидроаскорбатредуктазы [27].

Сравнение динамики содержания АК в зеленых листьях лука-порея при нормальных и низкотемпературных условиях выявило значительные различия (рис. 3б). Наблюдаемое снижение содержания АК в листьях при нормальных условиях через 2 ч после включения света связано с тем, что АК расходуется в качестве специфического донора электронов ферментом аскорбатпероксидазой для детоксикации образующихся при фотосинтезе в хлоропластах АФК [28]. При холодовом стрессе

отсутствие изменения содержания АК в листьях лука-порей в течение 4 ч после включения освещения (рис. 3б) может быть следствием снижения аскорбатпероксидазной активности в ответ на холод, однако данное предположение требует дополнительных исследований.

При сравнении данных по содержанию АК и уровню транскрипции *VTC2* был выявлен ряд особенностей. В первую очередь это то, что в зеленых листьях лука-порей и при нормальных условиях, и при холодовом стрессе уровни экспрессии *VTC2* и содержание АК через 24 ч были сопоставимы с исходными значениями (0 ч). Ранее подобная динамика экспрессии *VTC2* была показана для видов киви (*Actinidia eriantha* и *A. deliciosa*), в листьях которых уровни транскрипции *VTC2* значительно изменялись в ответ на различные абиотические стрессы через 12 и 24 ч воздействия, однако через 48 ч уровни транскрипции возвращались к исходным (0 ч) значениям [25]. С другой стороны, наблюдаемая нами возвратная динамика была характерна для точек 24 и 0 ч, которые соответствовали темному периоду (режим “ночь”), что может предполагать воздействие на экспрессию *VTC2* освещения.

В тех же точках (0 и 24 ч) при отсутствии освещения в зеленых листьях лука-порей в нормальных условиях выращивания (контроль) было выявлено максимальное содержание АК. Это соответствует уровням транскрипции *VTC2*, близким к максимальным в сравнении с другими точками, и предполагает сниженную активность ферментов деградации витамина С. В нормальных условиях при наличии освещения наблюдалась обратная зависимость между уровнем экспрессии *VTC2* и содержанием АК. При низких температурах в зеленых листьях такая корреляция либо отсутствовала (2 и 4 ч), либо также была отрицательной (6 ч) (рис. 3). Похожим образом, в проростках кукурузы в условиях холодового стресса при значительном росте уровня экспрессии *VTC2* содержание АК сначала увеличивалось (через 15 ч), а потом резко падало (через 30 ч) [19]. Таким образом, можно говорить о воздействии холодового стресса на уровень экспрессии *VTC2*, при этом может подавляться экспрессия генов ферментов деградации АК и/или аскорбатпероксидазы, либо могут активироваться альтернативные пути биосинтеза АК.

Обычно лук-порей хранится в овощехранилище при низкой температуре и без освещения. Можно предположить, что, как и краткий холодовый стресс, продолжительное воздействие низких температур не должно влиять на содержание витамина С и транскрипцию *VTC2*. Однако во всех анализируемых тканях всех исследуемых сортов экспрессия *VTC2* упала в декабре в сравнении с октябрем (рис. 1). При этом содержание АК у сортов варьировало без какой-либо единой зависимости (рис. 2).

Возможно, ответ на воздействие низких температур имеет свою специфику для каждого сорта. Уровень экспрессии *VTC2*, по всей видимости, никак не отражает особенности ответа растений лука-порей на длительное низкотемпературное хранение. Сохранение или же падение содержания АК, скорее, может зависеть от активности ферментов деградации АК или аскорбатпероксидазы. Более того, наблюдаемое четырехкратное повышение в декабре содержания АК в белой части сорта Vlaauwgroene winter может свидетельствовать об активации, помимо L-галактозного, также и других альтернативных путей биосинтеза АК.

В процессе хранения лука-порей может произойти активация образования АФК. При этом может возникнуть, например, ферментативное потемнение тканей из-за работы полифенолоксидазы (РРО), окисляющей полифенолы, и АК является одним из эффективных ингибиторов активности РРО [29]. Также, от содержания АК зависит уровень устойчивости растения к фитопатогенам, так как ответ на заражение включает активацию образования АФК, имеющие конечной целью нарушение окислительно-восстановительной защиты патогенов [30]. Одновременно, растению необходима защита самого себя от возникающего окислительного стресса, для чего оно и использует АК в качестве “поглотителя” АФК [30].

Полученные нами данные, касающиеся корреляции содержания АК и уровня экспрессии *VTC2*, а также эффект воздействия на нее низких температур, могут быть использованы как для характеристики сортов лука-порей на устойчивость к стрессам и хранению, так и для селекции новых сортов с повышенной устойчивостью. Кроме того, полученные результаты станут основой для дальнейшего изучения генетических основ биосинтеза аскорбиновой кислоты у видов *Allium*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 19-016-00054) и, частично, гранта Президента РФ (МК-3350.2019.11; определение профиля экспрессии гена *VTC2* в ответ на холодовый стресс), с использованием экспериментальной установки искусственного климата (ЭУИК) и Центра коллективного пользования “Биоинженерия” (Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук).

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. Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // Plant Physiol. Biochem. 2010. V. 48. P. 909.

2. *Bilska K., Wojciechowska N., Alipour S., Kalemba E.M.* Ascorbic acid-the little-known antioxidant in woody plants // *Antioxidants (Basel)*. 2019. V. 8. Article 645. <https://doi.org/10.3390/antiox8120645>
3. *Conklin P.L., Barth C.* Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence // *Plant Cell Environ.* 2004. V. 27. P. 959.
4. *Smirnoff N.* Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals // *Free Radicals Biol. Med.* 2018. V. 22. P. 116. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.033>
5. *Yang X.Y., Xie J.X., Wang F.F., Zhong J., Liu Y.Z., Li G.H., Peng S.A.* Comparison of ascorbate metabolism in fruits of two citrus species with obvious difference in ascorbate content in pulp // *J. Plant Physiol.* 2011. V. 168. P. 2196.
6. *Broad R.C., Bonneau J.P., Hellens R.P., Johnson A.A.T.* Manipulation of ascorbate biosynthetic, recycling, and regulatory pathways for improved abiotic stress tolerance in plants // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. Article 1790. <https://doi.org/10.3390/ijms21051790>
7. *Giovannoni J.J.* Completing a pathway to plant vitamin C synthesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007. V. 104. P. 9109.
8. *Ali B., Pantha S., Acharya R., Ueda Y., Wu L.-B., Ashrafuzzaman M., Ishizaki T., Wissuwa M., Bulley S., Frei M.* Enhanced ascorbate level improves multi-stress tolerance in a widely grown indica rice variety without compromising its agronomic characteristics // *J. Plant Physiol.* 2019. V. 240. Article 152998. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.152998>
9. *Dowdle J., Ishikawa T., Gatzek S., Rolinski S., Smirnoff N.* Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling // *Plant J.* 2007. V. 52. P. 673.
10. *Urzica E.I., Adler L.N., Page M.D., Linster C.L., Arbing M.A., Casero D., Pellegrini M., Merchant S.S., Clarke S.G.* Impact of oxidative stress on ascorbate biosynthesis in *Chlamydomonas* via regulation of the *VTC2* gene encoding a GDP-L-galactose phosphorylase // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. P. 14234. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.341982>
11. *Bernaert N., De Paepe D., Bouten C., De Clercq H., Stewart D., Van Bockstaele E., De Loose M., Van Droogenbroeck B.* Antioxidant capacity, total phenolic and ascorbate content as a function of the genetic diversity of leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*) // *Food Chem.* 2012. V. 134. P. 669. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.159>
12. *Liu M., Wu Z., Jiang F.* Selection and validation of garlic reference genes for quantitative real-time PCR normalization // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2015. V. 122. P. 435. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0780-9>
13. *Schwinn K.E., Ngo H., Kenel F., Brummell D.A., Albert N.W., McCallum J.A., Pither-Joyce M., Crowhurst R.N., Eady C., Davies K.M.* The onion (*Allium cepa* L.) R2R3-MYB gene *MYB1* regulates anthocyanin biosynthesis // *Front. Plant. Sci.* 2016. V. 7. Article 1865. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01865>
14. *Brenner C.* Hint, Fhit, and GalT: function, structure, evolution, and mechanism of three branches of the histidine triad superfamily of nucleotide hydrolases and transferases // *Biochem.* 2002. V. 41. № 29. P. 9003.
15. *Тяпкина Д.Ю., Кочиева Е.З., Слугина М.А.* Идентификация и анализ вариабельности генов-гомологов биосинтеза L-аскорбиновой кислоты *VTC2* у видов томата (*Solanum* секция *Lycopersicon*) // *Докл. АН.* 2018. Т. 483. С. 682. <https://doi.org/10.31857/S086956520003457-5>
16. *Huang M., Xu Q., Deng X.-X.* L-Ascorbic acid metabolism during fruit development in an ascorbate-rich fruit crop chestnut rose (*Rosa roxburghii* Tratt) // *J. Plant Physiol.* 2014. V. 171. P. 1205. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.03.010>
17. *Dewhurst R.A., Clarkson G.J.J., Rothwell S.D., Fry S.C.* Novel insights into ascorbate retention and degradation during the washing and post-harvest storage of spinach and other salad leaves // *Food Chem.* 2017. V. 233. P. 237. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.082>
18. *dos Santos C.P., Batista M.C., da Cruz Saraiva K.D., Roque A.L.M., de Souza Miranda R., Alexandre E Silva L.M., Moura C.F.H., Alves Filho E.G., Canuto K.M., Costa J.H.* Transcriptome analysis of acerola fruit ripening: insights into ascorbate, ethylene, respiration, and softening metabolisms // *Plant Mol. Biol.* 2019. V. 101. P. 269. <https://doi.org/10.1007/s11103-019-00903-0>
19. *Xiang N., Hu J., Wen T., Brennan M.A., Brennan C.S., Guo X.* Effects of temperature stress on the accumulation of ascorbic acid and folates in sweet corn (*Zea mays* L.) seedlings // *J. Sci. Food Agric.* 2020. V. 100. P. 1694. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10184>
20. *Galani J.H.Y., Mankad P.M., Shah A.K., Patel N.J., Acharya R.R., Talati J.G.* Effect of storage temperature on vitamin C, total phenolics, UPLC phenolic acid profile and antioxidant capacity of eleven potato (*Solanum tuberosum*) varieties // *Hortic. Plant J.* 2017. V. 3. P. 73. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2017.07.004>
21. *Badejo A.A., Fujikawa Y., Esaka M.* Gene expression of ascorbic acid biosynthesis related enzymes of the Smirnof-Wheeler pathway in acerola (*Malpighia glabra*) // *J. Plant Physiol.* 2009. V. 166. P. 652. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.09.004>
22. *Franceschi V.R., Tarlyn N.M.* L-ascorbic acid is accumulated in source leaf phloem and transported to sink tissues in plants // *Plant Physiol.* 2002. V. 130. P. 649.
23. *Gao Q., Zhang L.* Ultraviolet-B-induced oxidative stress and antioxidant defense system responses in ascorbate-deficient *vtc1* mutants of *Arabidopsis thaliana* // *J. Plant Physiol.* 2008. V. 165. P. 138.
24. *Ioannidi E., Kalamaki M.S., Engineer C., Pateraki I., Alexandrou D., Mellidou I., Giovannoni J., Kanellis A.K.* Expression profiling of ascorbic acid-related genes during tomato fruit development and ripening and in response to

- stress conditions // *J. Exp. Bot.* 2009. V. 60. P. 663.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/ern322>
25. *Li J., Liang D., Li M., Ma F.* Light and abiotic stresses regulate the expression of GDP-L-galactose phosphorylase and levels of ascorbic acid in two kiwifruit genotypes via light-responsive and stress-inducible cis-elements in their promoters // *Planta.* 2013. V. 238. P. 535.  
<https://doi.org/10.1007/s00425-013-1915-z>
26. *Fukunaga K., Fujikawa Y., Esaka M.* Light regulation of ascorbic acid biosynthesis in rice via light responsive cis-elements in genes encoding ascorbic acid biosynthetic enzymes // *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 2010. V. 74. P. 888.  
<https://doi.org/10.1271/bbb.90929>
27. *Liu F., Xiang N., Hu J.G., Shijuan Y., Xie L., Brennan C.S., Huang W., Guo X.* The manipulation of gene expression and the biosynthesis of Vitamin C, E and folate in light- and dark-germination of sweet corn seeds // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. Article 7484.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-07774-9>
28. *Caverzan A., Passaia G., Rosa S.B., Ribeiro C.W., Lazzarotto F., Margis-Pinheiro M.* Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection // *Genet. Mol. Biol.* 2012. V. 35. P. 1011.  
<https://doi.org/10.1590/s1415-47572012000600016>
29. *Ferelli A.M.C., Bolten S., Szczesny B., Micallef S.A.* *Salmonella enterica* elicits and is restricted by nitric oxide and reactive oxygen species on tomato // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. P. 391.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00391>
30. *Sikora M., Świeca M.* Effect of ascorbic acid postharvest treatment on enzymatic browning, phenolics and antioxidant capacity of stored mung bean sprouts // *Food Chem.* 2018. V. 239. P. 1160.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.067>

## ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ФРАКЦИЙ СУММАРНЫХ ЛИПИДОВ ПОЧЕК РАСТЕНИЙ РОДА *Betula* L. ПО ФАЗАМ РАСПУСКАНИЯ

© 2021 г. И. В. Морозова<sup>а, \*</sup>, Н. П. Чернобровкина<sup>б</sup>, М. К. Ильинова<sup>б</sup>,  
Е. В. Робонен<sup>б</sup>, В. Д. Цыдендамбаев<sup>с</sup>, В. П. Пчёлкин<sup>с</sup>

<sup>а</sup>Институт водных проблем Севера – обособленное подразделение  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра  
“Карельский научный центр Российской академии наук”, Петрозаводск, Россия

<sup>б</sup>Институт леса – обособленное подразделение Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр  
Российской академии наук”, Петрозаводск, Россия

<sup>с</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений  
им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: irinamorozova1502@gmail.com

Поступила в редакцию 29.05.2020 г.

После доработки 31.05.2020 г.

Принята к публикации 31.05.2020 г.

У растений рода *Betula* L. в почках по фазам их распускания исследован жирнокислотный состав (ЖКС) фракций органических соединений, выделенных из суммарных липидов (СЛ) последовательными растворителями: хлороформом, ацетоном, метанолом, принятых соответственно за нейтральные липиды (НЛ), гликолипиды (ГЛ) и фосфолипиды (ФЛ) [1]. Установлено, что ЖКС фракций СЛ распускающихся почек деревьев с морфологическими признаками березы пушистой (*Betula pubescens* Ehrh.), березы повислой (*Betula pendula* Roth) и карельской березы (*Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti) представлен преимущественно ненасыщенными жирными кислотами (ННЖК) (до 88% от суммы жирных кислот). Основную долю ННЖК составляли линоленовая и линолевая кислоты (до 55 и 47% от суммы жирных кислот соответственно). Среди насыщенных жирных кислот (НЖК) количественно преобладала пальмитиновая кислота (до 42%). При развитии почек у всех трех берез во всех фракциях СЛ содержание линолевой кислоты понижалось при одновременном повышении содержания линоленовой кислоты в составе фракций ГЛ и ФЛ. У берез, различающихся по морфологическим признакам, выявлены особенности ЖКС фракций СЛ почек по фазам распускания.

**Ключевые слова:** *Betula pubescens*, *Betula pendula*, почки, фазы распускания, суммарные и нейтральные липиды, фосфо- и гликолипиды, жирные кислоты

DOI: 10.31857/S0015330321010139

### ВВЕДЕНИЕ

Поскольку жирнокислотный состав (ЖКС) мембранных и запасных липидов клеточных структур растений определяет их функциональную активность, его изучению посвящено большое количество работ. Из листовых древесных растений исследования проведены преимущественно на растениях рода *Betula* L., включающего много ценных видов и форм, широко распространенных в различных широтах и представляющих большой

научный и практический интерес [2–8]. При изучении сезонной динамики содержания липидов в почках различных видов березы было показано, что максимум их накопления приходится на осенне-зимний период [4]. Весной количество липидов в почках снижается, что объясняется использованием их на ростовые процессы. Проведенные нами исследования показали, что по фазам распускания почек березы отмечаются значительные изменения в содержании суммарных липидов (СЛ), их фракций и ЖКС СЛ [7]. Полученные данные позволяют заключить, что в период распускания почек при формировании ассимиляционного аппарата происходят значительные преобразования компонентов мембран, в частности входящих в их состав полярных липидов – гликолипидов (ГЛ) и

**Сокращения:** ГЛ – гликолипиды; ЖК – жирные кислоты; ЖКС – жирнокислотный состав; ИДС – индекс двойной связи; К – коэффициент ненасыщенности; НЖК – насыщенные жирные кислоты; НЛ – нейтральные липиды; ННЖК – ненасыщенные жирные кислоты; СЛ – суммарные липиды; ФЛ – фосфолипиды.

фосфолипидов (ФЛ), а также неполярных липидов — нейтральных липидов (НЛ). Динамика ЖКС фракций липидов по фазам распускания почек березы остается не исследованной. Имеются сведения о ЖКС фракций СЛ в распускающихся почках березы повислой и березы пушистой без учета фаз распускания [3]. Для выявления закономерностей изменения липидного состава в почках лиственных древесных растений в период перехода их к активной вегетации необходимо исследование ЖКС фракций СЛ по фазам распускания почек, в частности у растений рода *Betula L.*

При исследовании состава липидов по фазам распускания почек растений рода *Betula L.* нами были выявлены заметные отличия в динамике содержания СЛ, их фракций и ЖКС СЛ у березы пушистой, березы повислой и карельской березы [7]. Для понимания общих закономерностей и видовых особенностей изменения ЖКС фракций СЛ по фазам распускания почек растений рода *Betula L.* необходимо было провести исследование на различных видах березы. Актуальной остается и проблема идентификации одного из представителей рода *Betula L.*, характеризующегося ценной древесиной, — карельской березы, которую по морфологическим показателям не всегда можно определить на протяжении всего онтогенетического цикла [5].

Целью настоящей работы было исследование у различных представителей растений рода *Betula L.* ЖКС фракций суммарных липидов почек по фазам распускания.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали вегетативные почки 30-летних растений рода *Betula L.* с характерными морфологическими признаками березы пушистой (*Betula pubescens Ehrh.*) березы повислой (*Betula pendula Roth*) и карельской березы (*Betula pendula Roth var. carelica (Mercklin) Hämet-Ahti*), произрастающих на опытных участках агробиологической станции Карельского научного центра РАН, в окрестностях города Петрозаводска. Для проведения эксперимента была проведена идентификация исследуемых берез по морфологическим признакам, по которым отнесли исследуемые растения к двум видам и подвиду [4, 5]. Береза повислая характеризовалась прямым стройным стволом, была высотой 13–15 м, имела ажурную крону и свисающие вниз ветви, однолетние побеги были красновато-бурые со смолистыми железками — “бородавками”, поверхность листа — матовая. Береза пушистая характеризовалась также прямым стройным стволом, была высотой 10–12 м, имела плотную крону с распростертыми вверх ветвями, ауксипласты были красновато-бурого цвета, покрыты густым опушением, листья также характеризовались ярко выраженным опушением.

Карельская береза была прямоствольной, высотой 5–7 м, на стволе отмечалось наличие характерных вздутий, неровностей и бугорчатых выпуклостей, была выявлена высокая степень узорчатости текстуры древесины. Для исследований использовали по три растения с типичными для двух видов и подвида морфологическими признаками.

Исследования проводили с 29 апреля по 20 мая 2008 г. Почки со всех исследованных берез одновременно отбирали в утренние часы (10–11 ч) с боковых побегов средней части кроны, южной экспозиции в соответствии с фенофазами распускания почек: I фаза — набухание почек (почки заметно увеличиваются в размерах, конец апреля); II фаза — разverzание почек (в верхней части почек появляется конус молодых листьев, начало мая); III фаза — раскрытие вегетативных почек (молодые листья сложены в трубочку, вторая декада мая); IV фаза — молодые листья размером до 10 мм (обособление молодых листьев, поверхность листьев складчатая, видны черешки, третья декада мая) [9]. Фазы распускания почек у исследуемых растений прослеживали визуально, в год проведения эксперимента они совпадали по срокам.

Экстракцию из тканей СЛ и их очистку проводили по общепринятым методам [1]. СЛ извлекали системой растворителей — хлороформ : метанол (2 : 1, v/v). Разделение липидов на фракции выполняли методом колоночной хроматографии, где в качестве неподвижной фазы использовали силикагель Davisil Silica gel (mesh) 100–200, а в качестве подвижной фазы — систему последовательных растворителей: хлороформ, ацетон, метанол для экстракции НЛ, ГЛ и ФЛ соответственно. Система растворителей хлороформ : метанол позволяет экстрагировать углеводороды, спирты, альдегиды, кетоны и хиноны, нормальные насыщенные кислоты, воски, эфиры стероидов и спиртов, витаминов А, D, E, простые эфиры глицерина, фосфолипиды, гликолипиды. Дальнейшее разделение липидной смеси элюентами с разной степенью полярности приводит к делению СЛ на следующие фракции: НЛ (неполярные компоненты) — углеводороды, каротиноиды и хлорофилл, воски, жирные кислоты (ЖК), альдегиды, кетоны; ГЛ (слабо полярные компоненты) — моно- и дигалактозилдиглицериды, цереброзиды, гликозиды стероидов, сульфолипиды кардиолипина и фосфатидовой кислоты, следовые количества НЛ; ФЛ (сильно полярные компоненты) представляют собой ФЛ и следы ГЛ [1]. Поэтому представленное в нашей работе обозначение фракций базировалось на общепринятой методике и обосновывалось преобладанием в них определенных фракций липидов. Объем растворителя, необходимый для полного извлечения каждой фракции, контролировали методом сжигания липидов в концентрированной серной кислоте при 200°C (в электрическом

блоке 15 минут) с последующим измерением растворов на спектрофотометре при 375 нм.

Жирные кислоты СЛ исследовали в виде метиловых эфиров, которые получали переэтерификацией липидов метанолом в присутствии ацетилхлорида. Разделение смеси ЖК на составляющие компоненты осуществляли на газожидкостном хроматографе “Хроматэк–Кристалл 5000.1” (Йошкар-Ола, Россия) с использованием капиллярной колонки Zebtron ZB-FFAP (50 м × 0.32 мм). Анализ проводили в изотермическом режиме: температура колонки составляла 190°C, испарителя – 240°C, пламенно-ионизационного детектора – 260°C. В качестве газа-носителя использовали азот. Скорость пропускания через колонку азота, водорода, воздуха составляла 50, 40, 400 мл/мин соответственно. ЖК идентифицировали с помощью сравнения со стандартным набором ЖК (Supelko, 37 компонентов, США), а также сопоставлением эквивалентной длины цепи с табличными данными [10]. Концентрацию ЖК рассчитывали методом процентной нормализации по площадям пиков [11]. ЖК были выделены в группы, отличающиеся по числу двойных связей в углеродной цепи: ненасыщенные (моно-, ди- и триеновые) жирные кислоты (ННЖК) и насыщенные (без двойных связей) жирные кислоты (НЖК). Для сравнительного анализа фракций липидов почек у разных берез были использованы главные ЖК: пальмитиновая (C<sub>16:0</sub>), стеариновая (C<sub>18:0</sub>), олеиновая (C<sub>18:1</sub>), линолевая (C<sub>18:2</sub>), линоленовая (C<sub>18:3</sub>).

Индекс двойной связи (ИДС), характеризующий степень ненасыщенности жирных кислот рассчитывали согласно методу Lyons с соавт. [12] по формуле:

$$\text{ИДС} = (\text{М} + 2 \times \text{Д} + 3 \times \text{Тр} + 4 \times \text{Тетр}) / 100, \quad (1)$$

где М – моноеновые, Д – диеновые, Тр – триеновые, Тетр – тетраеновые кислоты, % от суммы жирных кислот.

Коэффициент ненасыщенности (К) жирных кислот определяли по формуле:

$$\text{К} = \Sigma \text{ННЖК} / \Sigma \text{НЖК}. \quad (2)$$

Математическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Microsoft Excel. Результаты представлены в виде средних значений 3–6 биологических повторностей и их стандартных ошибок.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Динамика ЖКС фракций СЛ у распускающихся почек растений рода Betula L.*

Фракции СЛ почек берез содержали высокий уровень ННЖК – НЛ и ГЛ (45–88%), ФЛ – 65–78% от суммы жирных кислот каждой фракции (табл. 1). Однонаправленного изменения содер-

жания суммы ННЖК фракций СЛ почек трех берез в процессе распускания не происходило. Особенно стабильным было их содержание во фракции ФЛ. Значения ИДС и К ЖК фракций СЛ почек трех берез также не изменялись однозначно. Группу ННЖК фракций СЛ почек исследованных берез по фазам распускания составляли преимущественно линоленовая (C<sub>18:3</sub>) и линолевая (C<sub>18:2</sub>) кислоты (до 55 и 47% от суммы жирных кислот соответственно). Уровень линоленовой кислоты во всех фракциях СЛ почек исследованных берез в процессе их распускания повышался или имел тенденцию к повышению. Содержание линолевой кислоты во фракциях СЛ при распускании почек снижалось. Наиболее значительное повышение содержания линоленовой и снижение уровня линолевой кислоты отмечалось в ГЛ. В трех фракциях СЛ почек исследованных берез среди НЖК преобладала пальмитиновая (до 43% от суммы жирных кислот каждой фракции). В период распускания почек берез однонаправленного изменения содержания пальмитиновой и стеариновой кислот во фракциях СЛ не наблюдалось.

Исследование особенностей ЖКС фракций СЛ по фазам распускания почек у различающихся по морфологическим признакам растений рода *Betula L.* показало, что у березы пушистой, в отличие от березы повислой и карельской березы, отмечался высокий уровень суммы НЖК во фракциях НЛ и ГЛ, что было обусловлено преимущественно высоким содержанием пальмитиновой кислоты (кроме III фазы). Березу пушистую отличало также пониженное содержание линолевой и олеиновой кислот при повышенном уровне пальмитиновой и стеариновой кислот во фракции ГЛ в I и II фазы распускания почек. У березы повислой, в отличие от других берез, происходило значительное снижение уровня линолевой кислоты при повышении пальмитиновой в составе фракции ГЛ в процессе развития почек от I к III фазе и понижение уровня линолевой кислоты во фракции ФЛ. Карельскую березу характеризовало повышенное содержание ННЖК во фракции НЛ почек по фазам распускания, обусловленное высоким содержанием линолевой кислоты при низком уровне пальмитиновой. Уровни суммы ННЖК и, соответственно, НЖК, а также олеиновой и стеариновой кислот фракции ФЛ почек у трех берез были очень близкими и оставались стабильными в течение периода распускания почек.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы исследовали динамику содержания СЛ, их фракций и ЖКС СЛ в почках растений рода *Betula L.* (березы пушистой, березы повислой и карельской березы) по фазам распускания [7]. Содержание СЛ варьировало от 27 до 45% от абсо-

**Таблица 1.** Содержание жирных кислот (ЖК) фракций нейтральных (НЛ), глико- (ГЛ) и фосфолипидов (ФЛ) почек разных видов и формы *Betula L.* по фазам распускания

ЖК	Береза пушистая				Береза повислая				Карельская береза			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
C <sub>16:0</sub>	34.6 ± 2.4	42.5 ± 3.0	38.1 ± 2.7	30.9 ± 2.2	30.3 ± 2.1	29.3 ± 2.0	31.6 ± 2.2	29.8 ± 2.1	11.9 ± 0.8	18.3 ± 1.3	15.5 ± 1.1	25.6 ± 1.8
	14.8 ± 1.0	12.1 ± 0.8	3.4 ± 0.2	10.6 ± 0.7	7.1 ± 0.5	2.1 ± 0.1	5.3 ± 0.4	0.9 ± 0.1	2.0 ± 0.1	4.1 ± 0.3	3.1 ± 0.2	4.6 ± 0.3
	7.1 ± 0.5	4.5 ± 0.3	14.2 ± 1.0	11.6 ± 0.8	9.3 ± 0.6	12.1 ± 0.8	12.4 ± 0.9	14.8 ± 1.0	6.8 ± 0.5	10.2 ± 0.7	8.7 ± 0.6	4.0 ± 0.3
	31.5 ± 2.2	26.2 ± 1.8	30.3 ± 2.1	21.1 ± 1.5	32.5 ± 2.3	30.3 ± 2.1	25.4 ± 1.8	26.8 ± 1.9	45.2 ± 3.2	39.6 ± 2.8	42.7 ± 3.0	38.7 ± 2.7
C <sub>18:0</sub>	12.0 ± 0.8	14.7 ± 1.0	14.0 ± 1.0	16.8 ± 1.2	21.0 ± 1.5	26.3 ± 1.8	25.4 ± 1.8	24.0 ± 1.7	34.1 ± 2.4	27.8 ± 1.9	30.0 ± 2.1	30.8 ± 2.2
	49.5 ± 3.5	54.6 ± 3.8	41.4 ± 2.9	50.5 ± 3.5	37.3 ± 2.6	31.3 ± 2.2	36.8 ± 2.6	34.4 ± 2.4	14.0 ± 1.0	22.4 ± 1.6	18.6 ± 1.3	26.5 ± 1.9
	50.6 ± 3.5	45.4 ± 3.2	58.6 ± 4.1	49.5 ± 3.5	62.7 ± 4.4	68.7 ± 4.8	63.2 ± 4.4	65.6 ± 4.6	86.1 ± 6.0	77.6 ± 5.4	81.4 ± 5.7	73.5 ± 5.1
	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.7 ± 0.1	2.2 ± 0.2	1.7 ± 0.1	1.9 ± 0.1	6.2 ± 0.4	3.5 ± 0.2	4.4 ± 0.3	2.8 ± 0.2
ИДС	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1	2.0 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.1
	ГЛ											
	31.2 ± 2.2	23.6 ± 1.7	21.7 ± 1.5	21.9 ± 1.5	10.1 ± 0.7	14.3 ± 1.0	26.8 ± 1.9	20.9 ± 1.5	16.3 ± 1.1	19.3 ± 1.4	17.8 ± 1.2	15.5 ± 1.1
	12.1 ± 0.8	10.1 ± 0.7	5.0 ± 0.3	9.4 ± 0.7	2.1 ± 0.1	2.1 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.1	3.2 ± 0.2	2.4 ± 0.2	2.8 ± 0.2	3.1 ± 0.2
C <sub>18:1</sub>	4.2 ± 0.3	2.5 ± 0.2	10.5 ± 0.7	6.6 ± 0.5	8.8 ± 0.6	12.6 ± 0.9	9.2 ± 0.6	9.0 ± 0.6	9.6 ± 0.7	10.4 ± 0.7	9.9 ± 0.7	17.8 ± 1.2
	17.6 ± 1.2	16.6 ± 1.2	17.1 ± 1.2	11.4 ± 0.8	36.9 ± 2.6	26.9 ± 1.9	10.7 ± 0.7	11.7 ± 0.8	33.0 ± 2.3	29.4 ± 2.1	26.0 ± 1.8	19.9 ± 1.4
	34.9 ± 2.4	47.3 ± 3.3	45.8 ± 3.2	50.8 ± 3.6	42.1 ± 2.9	44.2 ± 3.1	51.5 ± 3.6	55.4 ± 3.9	37.8 ± 2.6	38.5 ± 2.7	43.5 ± 3.0	45.1 ± 3.2
	43.3 ± 3.0	33.7 ± 2.4	26.6 ± 1.9	31.2 ± 2.2	12.2 ± 0.9	16.4 ± 1.1	28.6 ± 2.0	23.9 ± 1.7	19.6 ± 1.4	21.7 ± 1.5	20.6 ± 1.4	17.2 ± 1.2
C <sub>18:2</sub>	56.7 ± 4.0	66.3 ± 4.6	73.4 ± 5.1	68.8 ± 4.8	87.8 ± 6.1	83.6 ± 5.9	71.4 ± 5.0	76.1 ± 5.3	80.4 ± 5.6	78.3 ± 5.5	79.4 ± 5.6	82.8 ± 5.8
	1.3 ± 0.1	2.0 ± 0.1	2.8 ± 0.2	2.2 ± 0.2	7.2 ± 0.5	5.1 ± 0.4	2.5 ± 0.2	3.2 ± 0.2	4.1 ± 0.3	3.6 ± 0.3	3.9 ± 0.3	4.8 ± 0.3
	1.4 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1	2.1 ± 0.1	2.0 ± 0.1	1.9 ± 0.1	2.0 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.9 ± 0.1
	ФЛ											
C <sub>16:0</sub>	31.6 ± 2.2	30.7 ± 2.1	27.0 ± 1.9	32.3 ± 2.3	26.4 ± 1.8	27.1 ± 1.9	32.3 ± 2.3	24.9 ± 1.7	28.9 ± 2.0	30.1 ± 2.1	29.8 ± 2.1	20.6 ± 1.4
	2.1 ± 0.1	2.0 ± 0.1	2.5 ± 0.2	2.7 ± 0.2	1.9 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.5 ± 0.1	2.1 ± 0.1	3.4 ± 0.2	1.7 ± 0.1	1.5 ± 0.1
	4.5 ± 0.3	2.9 ± 0.2	6.7 ± 0.5	2.6 ± 0.2	6.7 ± 0.5	1.9 ± 0.1	4.5 ± 0.3	3.2 ± 0.2	2.3 ± 0.2	3.1 ± 0.2	2.9 ± 0.2	4.7 ± 0.3
	46.5 ± 3.3	43.6 ± 3.1	42.7 ± 3.0	37.8 ± 2.6	39.9 ± 2.8	36.1 ± 2.5	34.0 ± 2.4	31.0 ± 2.2	44.6 ± 3.1	43.3 ± 3.0	39.3 ± 2.8	36.3 ± 2.5
C <sub>18:0</sub>	15.4 ± 1.1	20.8 ± 1.5	21.1 ± 1.5	24.7 ± 1.7	25.2 ± 1.8	33.6 ± 2.3	27.5 ± 1.9	39.4 ± 2.8	22.1 ± 1.5	20.1 ± 1.4	26.3 ± 1.8	36.8 ± 2.6
	33.7 ± 2.4	32.7 ± 2.3	29.5 ± 2.1	34.9 ± 2.4	28.3 ± 2.0	28.5 ± 2.0	34.1 ± 2.4	26.4 ± 1.9	31.1 ± 2.2	33.5 ± 2.3	31.5 ± 2.2	22.2 ± 1.6
	66.3 ± 4.6	67.3 ± 4.7	70.5 ± 4.9	65.1 ± 4.6	71.7 ± 5.0	71.5 ± 5.0	65.9 ± 4.6	73.6 ± 5.1	69.0 ± 4.8	66.5 ± 4.7	68.5 ± 4.8	77.8 ± 5.4
	2.0 ± 0.1	2.1 ± 0.1	2.4 ± 0.2	1.9 ± 0.1	2.5 ± 0.2	2.5 ± 0.2	1.9 ± 0.1	2.8 ± 0.2	2.2 ± 0.2	2.0 ± 0.1	2.2 ± 0.2	3.5 ± 0.2
ИДС	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.9 ± 0.1

Примечание.  $\Sigma$ НЖК – сумма насыщенных жирных кислот,  $\Sigma$ ННЖК – сумма ненасыщенных жирных кислот, К – коэффициент ненасыщенности жирных кислот, ИДС – индекс двойной связи.

лютно сухой массы (а.с.м.). В составе СЛ преобладали НЛ (до 42% от а.с.м.). НЛ – это эфиры глицерина и ЖК, они служат формой хранения углерода в растениях и используются в основном как источник энергии и запасных соединений для роста побегов и листьев [8]. Отмечалось снижение уровня НЛ в почках берез на первых этапах распускания, что могло быть следствием интенсивного использования их на ростовые процессы, когда еще не происходит в достаточном количестве пополнения энергетического материала в клетках растений за счет фотосинтеза и поступления элементов питания из почвы.

Фракции ГЛ и ФЛ не превышали 13 и 8% от а.с.м. соответственно [7]. Однонаправленного для всех берез изменения содержания ГЛ в процессе распускания почек не наблюдалось. ГЛ – сложные липиды, включающие углеводную группу. Они являются основными компонентами тилакоидных мембран хлоропластов. ФЛ составляют основу всех мембран клетки. Уровень этой фракции липидов у трех берез повышался в фазу раскрытия почек. Очевидно, в этот период, в III фазу распускания почек, когда почки раскрываются и появляются молодые листья, ФЛ в них активно синтезируются и принимают участие в формировании клеточных структур. Проведенное ранее сравнительное исследование липидного состава распускающихся почек (без учета фаз развития) и молодых листьев у березы повислой и березы пушистой показало, что при распускании почек существенно повышается содержание ФЛ в связи с активным образованием мембран клетки [3]. Позже мы установили, что этот процесс происходит в III фазу распускания почек [7]. Также перед появлением хвои в меристемах почек хвойных растений содержится ГЛ и ФЛ в мембранах значительно возрастает, что объясняется увеличением размеров клеток и формированием их фотосинтетического аппарата [13, 14].

В СЛ почек разных видов березы преобладали диеновые и триеновые кислоты, в СЛ листьев – триеновые [2, 3]. Предполагается, что при формировании листьев происходит десатурация ЖК с образованием новых двойных связей. ННЖК СЛ почек берез по фазам распускания составляли до 85% от суммы ЖК [7]. Преобладание ННЖК в липидах почек позволяет сохранять текучесть мембран их тканей на физиологически активном уровне, обеспечивающем интенсивные процессы формирования фотоассимиляционного аппарата в распускающихся почках и устойчивость их к возможным неблагоприятным климатическим условиям в весенний период, прежде всего, к понижению температуры. У растений, синтезирующих ННЖК, проявляются типичные обратные отношения между температурой среды и накоплением ННЖК в составе мембранных липидов [15, 16].

Основной вклад в группу ННЖК СЛ почек исследованных видов берез вносят линолевая и линоленовая ЖК (до 44 и 39% от суммы ЖК соответственно), в группу НЖК – пальмитиновая ЖК (до 32%) [7]. Содержание линолевой кислоты снижается в СЛ почек берез в процессе их распускания, что может быть обусловлено ее использованием в метаболических процессах, направленных на формирование структур молодого листа. Во время дальнейшего роста листа содержание линоленовой кислоты продолжает снижаться, при этом накапливаются триеновые кислоты, преимущественно линоленовая, активно участвующая в процессе фотосинтеза [17].

Выявленный в данном исследовании высокий уровень ННЖК во всех фракциях липидов по фазам распускания почек исследованных берез свидетельствует о высокой степени жидкостности мембран клеток развивающихся почек, что, очевидно, является необходимым условием для активно протекающих в этот период метаболических процессов и обеспечивает защитные функции растений от возможных неблагоприятных климатических условий в весенний период. Также в мужских соцветиях *Betula pendula* Roth в период весеннего их развития в начальную фазу цветения в условиях относительно низких температур сумма ННЖК превышала сумму насыщенных во всех фракциях СЛ, особенно во фракциях мембранных липидов, в которых количество ННЖК было вдвое больше, чем насыщенных [18]. По мере повышения температуры среды, к фазе разрыхления тычиночных соцветий, происходило накопление НЖК в НЛ (до 70% и выше от суммы жирных кислот) и в ГЛ (до 50% и выше от суммы ЖК). При этом в ФЛ отмечалось устойчивое преобладание ННЖК, и в большей степени – линолевой кислоты (до 65% и выше от суммы ЖК), независимо от фазы развития мужских соцветий. Высокая степень ненасыщенности ЖК мембранных липидов определяет физическое состояние биологических мембран, что важно для поддержания текучести липидного окружения мембранных белков, особенно ферментов, и обеспечения пропускной способности мембран для ионов и молекул, а это, в свою очередь, определяет характер и интенсивность метаболизма в клетках [19].

Согласно результатам нашего исследования, группу ННЖК всех фракций СЛ почек трех берез составляли преимущественно линоленовая ( $C_{18:3}$ ) и линолевая ( $C_{18:2}$ ) кислоты, которые могут синтезироваться в растениях, в отличие от животных, и именно они в основном определяют состояние мембран [14, 20]. Значительное, повышающееся по фазам распускания почек количество линоленовой кислоты во фракциях СЛ обеспечивает активные метаболические процессы, связанные с формированием фотоассимиляционного аппара-

та, при переходе растения из состояния вынужденного покоя к активной вегетации. Полученные данные по снижению уровня линолевой кислоты при повышении содержания линоленовой во фракциях СЛ, особенно во фракции ГЛ, по фазам распускания почек согласуются с литературными данными. В работе Ветчинниковой с соавт. [2] также наблюдалось повышенное содержание триеновых кислот (главным образом линоленовой) за счет пониженного уровня диеновых (преимущественно линолевой) в СЛ листьев по сравнению с почками у березы повислой и березы пушистой. Рост листовой пластинки у березы повислой и березы пушистой сопровождался снижением относительного содержания линолевой кислоты и повышением — линоленовой, что было наиболее выражено в ГЛ листьев [3]. Увеличение степени ненасыщенности ЖК в процессе развития листа связывают с биогенезом хлоропластов, мембраны тилакоидов которых отличаются высоким содержанием ННЖК (до 85–90% от суммы жирных кислот) [21]. Также при исследовании динамики ЖКС СЛ хвои ели сибирской (*Picea obovata* L.) в течение первой половины вегетационного периода (март—июль) было показано, что весенний максимум содержания линоленовой кислоты совпадал с максимумом содержания хлорофиллов в светособирающих комплексах фотосинтетических единиц и началом нетто-ассимиляции CO<sub>2</sub>, летний — с самым высоким за исследуемый период содержанием хлорофиллов [22].

Триеновые ЖК обладают значительно более низкой, по сравнению с насыщенными, моно- и диеновыми ЖК температурой плавления, что крайне важно для сохранения мембранами жидкокристаллического состояния, обеспечивающего активное протекание метаболических процессов в клетке. Преимущественное накопление линоленовой кислоты именно в тилакоидных мембранах хлоропластов обусловлено той важной ролью, которую она играет в процессе фотосинтеза. Она способна принимать спиральную конформацию, что позволяет включающим ее липидам образовывать комплексы с мембранными белками и пигментами при построении фотосинтетических субъединиц и обеспечивает возможность переноса электронов по электрон-транспортной цепи хлоропластов [17].

Сравнительный анализ показал, что максимальное содержание ННЖК в почках растений рода *Betula* и в органах хвойных растений зафиксировано в зимний период, что обеспечивает поддержание жидкого фазового состояния мембран [4, 13, 23]. При переходе лиственных и хвойных древесных растений от зимнего к весеннему периоду повышается скорость гидрогенизации двойных связей ННЖК липидов почек и, как следствие, происходит снижение их доли в ЖКС липидов. Также, как при росте молодого листа березы, при

формировании фотосинтетического аппарата в клетках молодой хвои *Larix sibirica* Ledeb., *Picea obovata* Ledeb. и *Pinus sylvestris* L. в составе ННЖК ГЛ почти вдвое возрастала доля триеновых ЖК [13]. Следует отметить, что у *Pinus sylvestris* L. повышение относительного содержания линоленовой кислоты в липидах хлоропластных мембран хвои происходило и при ингибировании фотосинтетического аппарата в результате их реорганизации в условиях понижения температуры и освещенности в осенний период, что объясняется ее ролью в адаптации растительного организма к неблагоприятным условиям среды [16]. Изменения в ЖКС лиственных и хвойных древесных растений свидетельствуют о наличии у них определенной аналогии в перестройке клеточного метаболизма в сезонных циклах их развития.

*Особенности ЖКС фракций СЛ почек по фазам распускания у различающихся по морфологическим признакам растений рода Betula L.*

Поскольку период распускания почек березы протекает в относительно короткие сроки (в среднем за три недели), и в этот период в них особенно интенсивно происходят процессы, направленные на формирование фотосинтетического аппарата [24], этот период представляет интерес для выявления особенностей изменения липидного состава почек по фазам распускания у разных видов и форм березы. На основании сравнительного исследования фракционного и ЖКС СЛ почек *Betula pubescens*, *B. pendula* и *B. pendula* var. *carelica* по фазам в период распускания нами были представлены отличительные особенности по этим показателям для различных видов растений рода *Betula* L. [7]. У березы пушистой, в отличие от двух других берез, отмечался высокий уровень СЛ и фракции НЛ в набухших почках и молодых (до 10 мм) листьях; низкий уровень ГЛ и ФЛ, за исключением фазы раскрытия почек; высокое содержание НЖК (до 51% от суммы) (кроме III фазы), обусловленное преимущественно высоким уровнем пальмитиновой и стеариновой кислот; низкий уровень линоленовой кислоты и олеиновой (кроме III фазы). Результаты данного исследования показали, что у березы пушистой высокий уровень суммы НЖК СЛ обусловлен высоким содержанием их во фракциях НЛ и ГЛ за счет высокого уровня пальмитиновой кислоты (кроме III фазы). Березу пушистую отличало также пониженное содержание линолевой и олеиновой кислот при повышенном уровне пальмитиновой и стеариновой кислот во фракции ГЛ в I и II фазы распускания почек. У растений с морфологическими показателями березы пушистой по сравнению с березой повислой, идентифицированной по морфологическим признакам, ранее отмечали в СЛ почек

повышенный уровень насыщенных, а также короткоцепочечных ЖК [2, 4].

У близкородственных растений – березы повислой и ее подвида карельской березы – показатели, характеризующие содержание СЛ, фракций СЛ и ЖКС СЛ в почках по фазам распускания были сходны [7]. Исследование ЖКС фракций СЛ почек трех берез по фазам распускания позволило выявить различия у них по этому показателю на уровне всех фракций. У березы повислой, в отличие от других берез, происходило значительное снижение уровня линолевой кислоты при повышении пальмитиновой в составе фракции ГЛ в процессе развития почек от I к III фазе и пониженный уровень линолевой кислоты во фракции ФЛ в период исследования. Карельскую березу характеризовало повышенное содержание ННЖК во фракции НЛ распускающихся почек, обусловленное высоким содержанием линолевой кислоты при низком уровне пальмитиновой. Такие показатели ЖКС фракции ФЛ, как уровни суммы ННЖК и, соответственно, НЖК, а также олеиновой и стеариновой кислот были относительно близкими в почках трех берез и оставались стабильными в течение всех фаз периода распускания почек.

Сопоставление полученных нами данных с имеющимися сведениями в литературе показало, что в весенний период динамика ННЖК в почках лиственных древесных пород (судя по березе) отличается от хвойных растений, а также имеет особенности внутри видов лиственных и хвойных пород [2–4, 7, 13]. Предполагается, что у хвойных растений существует, по крайней мере, два различных механизма низкотемпературной адаптации липидного мембранного матрикса. У *Picea obovata* L. и *Pinus sylvestris* L. механизм адаптации связан с индукцией экспрессии десатуразных генов, у *Larix sibirica* Ledeb. – с активацией ацил-липидных десатураз и синтезом низкомолекулярных короткоцепочечных ( $C < 16$ ) ЖК преимущественно с нечетным числом атомов углерода [13].

Таким образом, в результате проведенных исследований у растений рода *Betula* L. выявлены общие закономерности изменения содержания ЖК фракций СЛ в почках по фазам распускания. Выявленное преобладание ННЖК во всех фракциях СЛ почек берез позволяет сохранять текучесть мембран их тканей на физиологически активном уровне, обеспечивающем интенсивные метаболические процессы, направленные на формирование фотоассимиляционного аппарата в распускающихся почках и устойчивость их к возможным неблагоприятным климатическим условиям в весенний период.

Основной вклад в группу ННЖК фракций СЛ почек берез вносят линоленовая и линолевая, в группу НЖК – пальмитиновая. Установленное

снижение содержания линолевой кислоты во всех фракциях почек трех берез в процессе их распускания, вероятно, связано с использованием этой кислоты в метаболических процессах, направленных на формирование структур молодого листа, при дальнейшем росте которого продолжается ее снижение, при этом накапливаются триеновые кислоты, преимущественно линоленовая, активно участвующая в процессе фотосинтеза.

Различия в содержании ЖК фракций СЛ почек по фазам распускания у двух видов и одного подвида растений рода *Betula* L. могут отражать особенности липидного обмена их тканей в процессе развития почек в весенний период. Физиолого-биохимические механизмы, обуславливающие процессы аккумуляции и использования липидных соединений в почках разных видов и форм растений рода *Betula* L. в годичном цикле их развития, в частности, по фазам распускания, остаются еще во многом не исследованными. Выявленные особенности ЖКС фракций липидов почек двух видов и одного подвида березы по фазам распускания расширяют возможности идентификации растений рода *Betula* L.

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания “Карельского научного центра Российской академии наук” (Институт леса “Карельского научного центра Российской академии наук”) и Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук.

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. Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975. 322 с.
2. Ветчинникова Л.В., Шуляковская Т.А., Канючкова Г.К. Жирнокислотный состав суммарных липидов различных органов *Betula pendula* Roth. и *B. pubescens* Ehrh., произрастающих в Карелии // Растит. ресурсы. 2000. Т. 36. № 2. С. 85.
3. Шуляковская Т.А., Ветчинникова Л.В., Канючкова Г.К., Ильинова М.К. Содержание липидов и жирнокислотный состав их фракций в различные фазы развития почек и листьев *Betula pendula* Roth и *B. pubescens* Ehrh // Растит. ресурсы. 2004. Т. 40. № 1. С. 69.
4. Ветчинникова Л.В. Береза: вопросы изменчивости. М.: Наука, 2004. 183 с.

5. *Ветчинникова Л.В.* Карельская береза и другие редкие представители рода *Betula* L. М.: Наука, 2005. 269 с.
6. *Морозова И.В., Чернобровкина Н.П., Ильинова М.К., Пчелкин В.П., Цыдендамбаев В.Д.* Содержание и состав жирных кислот суммарных липидов почек *Betula pubescens*, *B. pendula*, *B. pendula* var. *carelica* // Физиология растений. 2019. Т. 66. С. 146.
7. *Чернобровкина Н.П., Морозова И.В., Ильинова М.К.* Фракционный и жирнокислотный состав суммарных липидов почек растений рода *Betula* L. в период распускания // Труды КарНЦ РАН. Серия "Экспериментальная биология". 2019. № 6. С. 16.
8. *Piispanen R., Saranpää P.* Seasonal and within-stem variations of neutral lipids in silver birch (*Betula pendula*) wood // Tree Physiology. 2004. V. 24. P. 991.
9. *Ловчий Н.Ф., Ярошевич Э.П., Тютюнов А.З., Юркевич И.Д., Гельтман В.С.* Березовые леса Беларуси: типы, ассоциации, сезонное развитие и продуктивность. Минск: Навука і тэхніка, 1992. 183 с.
10. *Jamieson G.R.* GLC identification techniques for long-chain unsaturated fatty acids // J. Chromat. Sci. 1975. V. 13. P. 491.
11. *Столяров Б.В., Савинов И.М., Витенберг А.Г.* Руководство к практическим работам по газовой хроматографии. Л.: Химия, 1978. 288 с.
12. *Lyons J.M., Wheaton T.A., Pratt H.R.* Relationship between the physical nature of mitochondrial membranes and chilling sensitivity in plants // Plant Physiol. 1964. V. 39. P. 262.
13. *Алаудинова Е.В., Миронов П.В.* Липиды меристем лесообразующих хвойных пород центральной Сибири в условиях низкотемпературной адаптации. 2. Особенности метаболизма жирных кислот фосфолипидов меристем *Larix sibirica* Ledeb., *Picea obovata* L. и *Pinus sylvestris* L. // Химия растит. сырья. 2009. № 2. с. 71.
14. *Алаудинова Е.В., Миронов П.В.* Сосна обыкновенная: особенности метаболизма мембранных липидов живых тканей почек // ИВУЗ. Лесной журнал. 2011. № 4. С. 17.
15. *Sudachkova N.E., Milyutina I.L., Romanova L.I., Semenova G.P.* The annual dynamics of reserve compounds and hydrolytic enzymes activity in the tissues of *Pinus sylvestris* L. and *Larix sibirica* Ledeb. // Eurasian J. For. Res. 2004. V. 7. P. 1.
16. *Макаренко С.П., Коненкина Т.А., Суворова Г.Г., Оскорбина (Иванова) М.В.* Сезонные изменения жирнокислотного состава липидов хвои *Pinus sylvestris* // Физиология растений. 2014. Т. 61. С. 129.
17. *Laskay G., Lehoczki E.* Correlation between linolenic acid deficiency in chloroplast membrane lipids and decreasing photosynthetic activity in barley // Biochim. Biophys. Acta. 1986. V. 849. P. 77.
18. *Серебрякова О.С., Ветчинникова Л.В.* Жирнокислотный состав липидов мужских соцветий *Betula pendula* Roth в период весеннего развития // Труды КарНЦ РАН. Серия Эксперим. биология. 2018. № 6. С. 30.
19. *Лось Д.А.* Десатуразы жирных кислот. М.: Научный мир, 2014. 346 с.
20. *Попов В.Н., Антипина О.В., Пчелкин В.П., Цыдендамбаев В.Д.* Изменение жирнокислотного состава липидов хлоропластных мембран растений табака при низкотемпературном закаливании // Физиология растений. 2017. Т. 62. С. 109.
21. *Murphy D.J.* The molecular organisation of the photosynthetic membranes of higher plants // Biochim. Biophys. Acta. 1986. V. 864. P. 33.
22. *Иванова М.В., Макаренко С.П., Суворова Г.Г.* Жирнокислотный состав суммарных липидов хвои *Picea obovata* в весенний период вегетации // Сибирский эколог. журнал. 2018. Т. 25. С. 239.
23. *Романова И.М., Живетьев М.А., Дударева Л.В., Граскова И.А.* Динамика жирнокислотного состава и активности ацил-липидных десатураз в хвое *Pinus sylvestris* L., произрастающей в Иркутской области // Химия растит. сырья. 2016. № 2. С. 61.
24. *Николаева Н.Н.* Формирование листового аппарата у форм березы повислой (*Betula pendula* Roth.) с разной текстурой древесины: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. 2004. 28 с.

## ИНДУКЦИЯ САМ-ФОТОСИНТЕЗА У *Hylotelephium triphyllum* (Haw.) Holub (*Crassulaceae*) В УСЛОВИЯХ ЕВРОПЕЙСКОГО СЕВЕРО-ВОСТОКА РОССИИ

© 2021 г. Т. К. Головка<sup>а</sup>, И. Г. Захожий<sup>а, \*</sup>, Г. Н. Табаленкова<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар, Россия

\*e-mail: zakhzhij@ib.komisc.ru

Поступила в редакцию 24.03.2020 г.

После доработки 24.04.2020 г.

Принята к публикации 25.04.2020 г.

Исследовали сезонные и суточные изменения титруемой кислотности клеточного сока, содержание органических кислот и активность ФЕП-карбоксилазы в листьях очитника трехлистного (очитка пурпурного) *Hylotelephium triphyllum* (Haw.) Holub. В период генеративного развития растений кислотность клеточного сока возрастала в утренние часы с увеличением содержания малата, активность ФЕП-карбоксилазы повышалась в вечерние часы на фоне снижения его концентрации, что свидетельствует о переходе с C<sub>3</sub>-фотосинтеза на САМ-тип. Интенсивность β-карбоксилирования фосфоенолпирувата была наиболее выражена в фазу массового цветения на фоне повышения температуры и снижения влагообеспеченности растений. Установлено, что САМ-фотосинтез не вносит существенного вклада в углеродный баланс и продуктивность растений, о чем свидетельствуют величины изотопной дискриминации <sup>13</sup>C органического вещества листьев ( $\delta^{13}C$  около  $-27\text{‰}$ ) и других органов, близкие к изотопной сигнатуре C<sub>3</sub>-видов. Функционирование САМ в период цветения – плодоношения способствует сохранению фотосинтетического аппарата и реализации репродуктивного потенциала растений *H. triphyllum*, обитающих на легко теряющих влагу песчано-супесчаных почвах в условиях гумидного климата таежной зоны европейского Северо-Востока.

**Ключевые слова:** *Hylotelephium triphyllum*, C<sub>3</sub>-САМ переход, кислотность клеточного сока, малат, ФЕП-карбоксилаза, изотопное фракционирование углерода, онтогенез, условия среды

DOI: 10.31857/S0015330320060044

### ВВЕДЕНИЕ

Метаболизм по типу толстянковых (*Crassulaceae* Acid Metabolism, САМ), или САМ-фотосинтез, осуществляют примерно 6% всех видов сосудистых растений [1]. Существует мнение, что появлению в эволюции растений с САМ-типом фотосинтеза способствовали аридизация климата и снижение содержания CO<sub>2</sub> в атмосфере [2, 3]. Особенностью САМ является то, что первичная фиксация углекислоты (в форме HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) происходит при участии ФЕП-карбоксилазы в цитоплазме клеток хлоренхимы ночью, когда устьица открыты. Акцептором CO<sub>2</sub> служит фосфоенолпируват (ФЕП), образующийся в процессе гликолитического распада запасных углеводов. Образовавшийся при фиксации CO<sub>2</sub> малат переносится в вакуоли. Днем при закрытых устьицах идет обратный транспорт малата в цитоплазму, где происходит

его декарбоксилирование. Реассимиляция CO<sub>2</sub> осуществляется в цикле Кальвина-Бенсона с участием РуБФ-карбоксилазы/оксигеназы (C<sub>3</sub>-путь). Следовательно, в одной клетке функционируют две карбоксилазы. Хотя цена восстановления моля CO<sub>2</sub> при участии САМ выше, чем по C<sub>3</sub>-пути, снижение транспирационных потерь на единицу ассимилированного углерода обеспечивает преимущество САМ-растений над C<sub>3</sub>-растениями в сухих местообитаниях.

САМ-фотосинтез отличается высокой физиологической и метаболической пластичностью [4]. Экспрессия САМ зависит от генотипа, онтогенетических (фаза развития) и внешних факторов (влагообеспеченность, температурный режим, заселение, освещенность, фотопериод). Продолжительность малатного цикла, динамика пула углеводов и вклад ночной фиксации CO<sub>2</sub> в нетто-накопление углерода (прирост биомассы) могут существенно варьировать. Другими словами, диапазон САМ-растений довольно широкий: от видов, близких к C<sub>3</sub>-растениям, до видов, облигатных САМ. Про-

**Сокращения:** ОСВ – относительное содержание воды; ТК – титруемая кислотность;  $\delta^{13}C$  – отклонение соотношения изотопов углерода (<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C) образца от стандарта

межуточную позицию занимают факультативные САМ-виды, которые запускают САМ или выходят из него в зависимости от условий среды и/или стадии развития.

*Hylotelephium triphyllum* является одним из немногочисленных представителей сем. *Crassulaceae* (толстянковые) на Севере [5, стр. 22–28]. Виды данного семейства широко распространены по всему земному шару, однако большая их часть сосредоточена в аридных районах. Суккулентные черты и САМ-тип фотосинтеза отражают адаптацию этих растений к сухому и теплому климату.

Миграция толстянковых в северном направлении способствовала приобретению свойств гемикриптофитов и криптофитов (погружение почек возобновления в почву, сокращение онтогенеза, отмирание надземной части в период холодов и т.п.). Сохранив суккулентные черты, растения успешно осваивали местообитания с нестабильным водоснабжением.

Ранее нами было показано, что фотосинтетический аппарат толстянковых, обитающих в условиях холодного климата, хорошо адаптирован к низким положительным и умеренным температурам, что позволяет растениям обеспечить уровень метаболизма, необходимый для реализации жизненной стратегии на Севере [6].

Цель работы – изучение индукции и роли САМ у растений *Hylotelephium triphyllum*, произрастающих в природно-климатических условиях среднетаежной зоны европейского Северо-Востока России.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Очитник трехлистный (*Hylotelephium triphyllum* (Naw.) Holub) – многолетнее поликарпическое травянистое растение до 50 см в высоту. Побеги монокарпические, моноциклические, чаще одиночные или по два-три, плотно облиственные, неразветвленные. Листорасположение очередное, супротивное, листья уплощенные продолговато-яйцевидной формы с толстой кутикулой. Соцветие многоцветковое, цветки малиновые, пурпуровые, многочисленные. Подземная часть состоит из клубневидно-утолщенных корней и небольшого корневища. Размножается генеративным (семенами) и вегетативным способом (частями стеблей и корневища). В генеративный период особи *H. triphyllum* вступают в возрасте 4–5 лет и старше. Продолжительность генеративного периода составляет 5–6 лет. Сформированные семена полноценные с высокой всхожестью. Корневище укороченное, расположено на небольшой глубине, от него отходят хорошо развитые клубневидно утолщенные придаточные корни веретеновидной формы. Данный вид обычен в лесной зоне, встречается на опушках, полянах,

среди кустарников по лугам. На территории Республики Коми обычными местонахождениями являются пойменные кустарники, склоны, освещенные смешанные леса, вырубki, бечевники. Встречается на террасах в пойме, надпойме и прирусловой части поймы. Произрастает на глинистой, песчаной и супесчаной почве, известняках, сланцевых обнажениях и скалах.

Полевые исследования проведены в подзоне средней тайги Республики Коми. Климат района умеренно континентальный, характеризуется сравнительно длинной холодной снежной зимой и умеренно теплым коротким летом. Средняя температура самого теплого месяца июля около +16°C, а самого холодного месяца января –16°C. Средняя суточная температура воздуха выше 10°C наблюдается 90 дней в году. Среднегодовое количество осадков составляет 700 мм, испарение с поверхности суши – 450 мм. Исследования проводили в течение вегетационного периода 2016 – 2019 гг. В работе использовали растения, обитающие на дерново-слоистой песчано-супесчаной хорошо дренируемой почве в заливаемой части пойменной террасы левого берега р. Вызь (62°16'19.4" N 50°39'29.1" E). Участок находится в окрестностях Ляльского лесобиологического стационара Института биологии Коми НЦ УрО РАН.

Сведения о температуре воздуха и количестве осадков были получены из открытых архивов сайта “Расписание Погоды” (<https://rp5.ru>) и Автоматизированной Информационной Системы Обработки Режимной Информации – АИСОРИ (<http://aisori.meteo.ru/ClimateR>). Использовали данные для метеостанции г. Сыктывкара (синоптический индекс 23805), удаленной от местообитания исследуемых растений на 68 км. Расчет суммы активных температур выше 15°C и суммы осадков осуществляли для 20-дневного периода, предшествующего дате отбора растительных образцов. Микроклиматические условия – освещенность, температуру воздуха и почвы в местообитании растений регистрировали с помощью портативной метеостанции LI-1400 (“LI-COR”, США) с набором метеорологических датчиков.

Погодные условия вегетационного периода 2016 г. характеризовались повышенной по отношению к среднемноголетнему показателю температурой воздуха и близкому к норме количеству осадков с мая по июль (табл. 1). Вегетационные периоды 2017 и 2019 гг. были сравнительно прохладными с обильными осадками. Близкая к климатической норме погода наблюдалась в 2018 г.

Зрелые листья отбирали с верхней трети побегов 20–30 типичных растений в разное время суток в период вегетативного роста (май – июнь), бутонизации – цветения (июнь – июль) и плодоношения (август). Часть свежесобранных листьев использовали для определения содержания сухо-

**Таблица 1.** Погодные условия вегетационного периода в годы проведения исследований (по данным для метеостанции г. Сыктывкара, синоптический индекс 23805)

Годы	Среднемесячная температура (°С) / Сумма осадков (мм)			
	май	июнь	июль	август
2016	11.5/35	14.6/51	19.9/70	18.1/171
2017	5/54	12.4/98	18.3/79	16/83
2018	8.1/77	13.5/76	19.4/87	14.5/52
2019	10.9/84	13.6/90	15.3/134	11.3/111
Среднемноголетние показатели	8.5/41	14.3/59	17.5/73	14.2/59

го вещества и показателей водного обмена. Для насыщения водой листья размещали на фильтровальной бумаге в чашках Петри, заливали дистиллированной водой и выдерживали в закрытых чашках в течение 12 ч. Длительность экспозиции определяли в предварительном опыте. Относительное содержание воды (ОСВ) в листьях рассчитывали по формуле:

$$\text{ОСВ} = [(m_{\text{сыр}} - m_{\text{сух}}) / (m_{\text{нас}} - m_{\text{сух}})] \times 100\%,$$

где  $m_{\text{сыр}}$  и  $m_{\text{сух}}$  – масса свежесобранного и масса высушенного при 105°С образцов листьев,  $m_{\text{нас}}$  – масса образца листьев после 12-часового насыщения водой.

Дневной водный дефицит (ВД) находили по формуле:

$$\text{ВД} = [(m_{\text{нас}} - m_{\text{сыр}}) / (m_{\text{нас}} - m_{\text{сух}})] \times 100\%.$$

Для определения титруемой кислотности зафиксированные в жидком азоте образцы листьев (1.5 г) гомогенизировали в 10 мл дистиллированной воды, полученный экстракт центрифугировали в течение 10 мин при 12000 g и отбирали надосадочную жидкость. Общую кислотность супернатанта определяли методом потенциометрического титрования раствором гидроксида натрия (NaOH), используя рН-метр Hanna HI 8519 (“Hanna Instruments”, США). Суммарное содержание органических кислот в листьях выражали в экв. [H<sup>+</sup>]/г сырой массы.

Для анализа углеводов и органических кислот зафиксированный в жидком азоте растительный материал подвергали лиофильной сушке. Определение содержания водорастворимых низкомолекулярных углеводов выполняли спектрофотометрическим методом по колориметрированию избытка щелочного раствора гексацианоферрата (III) калия (K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]) после реакции с редуцирующими сахарами [7]. Здесь и далее при выполнении спектрофотометрических измерений применяли двулучевой спектрофотометр Shimadzu UV-1700 (“Shimadzu”, Япония).

Для определения содержания и состава свободных органических кислот и моносахаридов навеску (100 мг) образца лиофильно высушенных

листьев дважды экстрагировали свежими порциями (по 10 мл) дистиллированной воды при температуре 40°С. Полученный экстракт высушивали под вакуумом и подвергали силированию смесью, состоящей из N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамида (BSTFA) и триметилхлорсилана (TMCS) в пиридине в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя (<https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4800/4747.pdf>). Идентификацию триметилсилильных производных органических кислот и моносахаридов осуществляли на основании сопоставления масс-спектров и индексов удерживания стандартов и компонентов анализируемых растворов после проведения ГЖХ анализа на хромато-масс-спектрометре TRACE DSQ (“Thermo Fisher Scientific”, США). Количественное определение целевых компонентов проводили с помощью метода ГЖХ с пламенно-ионизационным детектированием на приборе Кристалл 200М (“Хроматэк”, Россия). В качестве внутреннего стандарта использовали гексадекан (C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>).

Определение активности ФЕП-карбоксилазы в растительном материале проводили по методике, описанной в статье [8] с незначительными модификациями. В работе использовали коммерческие реактивы производства “Sigma-Aldrich” (Германия). Зафиксированные в жидком азоте образцы листьев (500 мг) гомогенизировали в 5 мл 50 ммоль Tris HCl буфера (pH 8.2), содержащем 1 ммоль ЭДТА, 5 ммоль сульфата магния (MgSO<sub>4</sub>), 2 ммоль ДТТ, 1% Тритона X-100, 20% глицерина, 50 мг поливинилпирролидона (ПВП) и 20 мкл смеси ингибиторов протеаз (Protease Inhibitor Cocktail for plant cell and tissue extracts, DMSO solution). Гомогенат центрифугировали 10 мин при 12 000 g и отделяли от осадка. Процедуру выделения проводили при 4°С. Активность ФЕП-карбоксилазы в полученном экстракте определяли спектрофотометрически, оценивая изменение оптической плотности при 340 нм в реакции окисления НАД·Н в присутствии малатдегидрогеназы (МДГ). Для чего к реакционной среде – 50 ммоль Tris HCl буфер (pH 8.2) (2.95 мл), содержащий 10 Ед МДГ, 0.2 ммоль НАД·Н, 5 ммоль сульфата магния (MgSO<sub>4</sub>)

**Таблица 2.** Относительное содержание воды (ОСВ) и дневной водный дефицит (ВД) в листьях *Hylotelephium triphyllum* в период вегетативного роста и начала плодоношения

Дата	ОСВ, %	ВД, %	Доля сухого вещества, %
25–26.05.2016	91.4 ± 5.8	7.6 ± 0.4	7.6 ± 0.7
25–26.07.2016	74.7 ± 4.6	24.3 ± .5	7.4 ± 0.7

Примечание. Долю сухого вещества в листьях выражали в % от сырой массы свежесобранных образцов.

и 5 ммоль гидрокарбоната натрия ( $\text{NaHCO}_3$ ) добавляли аликвоту (50 мкл) экстракта ФЭП-карбоксилазы. Реакцию окисления НАД·Н инициировали путем добавления раствора ФЕП, конечная концентрация которого в реакционной среде составляла 2 ммоль. Скорость окисления НАД·Н измеряли в течение 3 мин после добавления ФЕП. Активность ФЕП- карбоксилазы определяли при 25°C и выражали в расчете на хлорофилл. Содержание хлорофиллов определяли в ацетоновых экстрактах растительного материала спектрофотометрически [9].

Изотопный состав углерода (соотношение изотопов  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) в растительных образцах исследовали на базе ЦКП “Геонаука” Института геологии Коми НЦ УрО РАН. Измерения проводились методом проточной масс-спектрометрии на аналитическом комплексе, включающем элементный анализатор Flash EA 1112 (“Thermo Fisher Scientific”, США) сопряженный с масс-спектрометром Delta V Advantage (“Thermo Fisher Scientific”, США). Отклонение изотопной сигнатуры  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  исследуемого образца от сигнатуры стандартного образца рассчитывали по формуле:

$$\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = \left[ \left( \frac{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{образца}}}{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{стандарта}}} \right) - 1 \right] \times 1000.$$

Результаты оценки  $\delta^{13}\text{C}$  растительных образцов приведены в промилле относительно стандарта PDB (Pee Dee Belemnite).

Все анализы проводили в 3–5-кратной биологической повторности. Для сравнения средних величин применяли дисперсионный анализ ANOVA (критерий Дункана). Расчеты осуществляли при заданном уровне значимости  $P \leq 0.05$ . На рисунках и в таблицах представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

*Особенности роста и развития растений Hylotelephium triphyllum.* Многолетние наблюдения показали, что отрастание побегов растений начинается в первой–второй декадах мая в зависимости

от продолжительности и силы весеннего половодья. Несмотря на высокую влагообеспеченность, сначала рост побегов замедленный, видимо из-за недостатка тепла и запаса углерода. По мере формирования листовой поверхности активность ростовых процессов возрастала. В период цветения высота растений составляла 35–45 см, сырая масса побега – около 30 г, а на долю листьев приходилось в среднем 30–35% массы побега. Линейный рост побега *H. triphyllum* детерминирован, появление новых метамеров прекращается с переходом растений к генеративному развитию.

Фаза цветения растений приурочена к самому теплому месяцу вегетационного периода – июлю (табл. 1). При среднемесячной температуре воздуха около 18°C максимальные температуры воздуха над поверхностью почвы могут достигать 28–30°C. При ясном небе в полуденные часы на уровне растений нами были зарегистрированы температуры воздуха в пределах 30–35°C, а почвы на глубине 5 см – 27–30°C. Относительная влажность воздуха составляла 45–50%, а влажность почвы не превышала 20%.

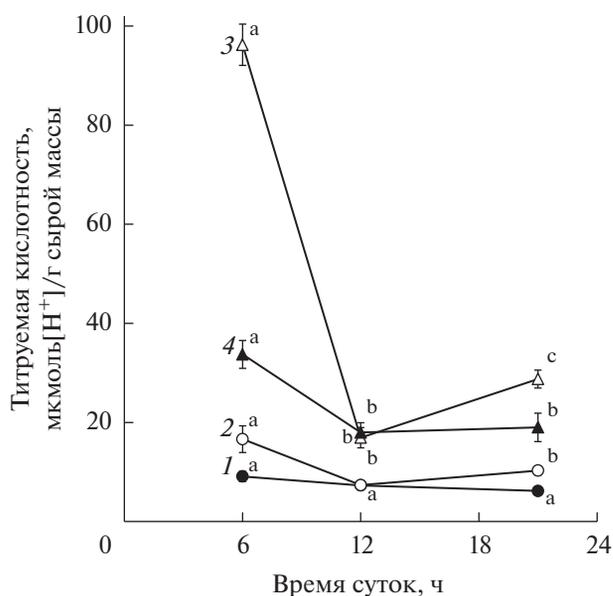
Относительное содержание воды в функционально зрелых листьях в фазу вегетативного роста составляло в среднем 90–92% (табл. 2). В период бутонизации – цветения величина ОСВ снижалась до 80–85%, в отдельных случаях – до 75% (табл. 2). Следует отметить, что отделенные листья хорошо удерживали воду, видимо вследствие накопления осмотически активных соединений, а также низкой устьичной и кутикулярной транспирации. В лабораторных условиях сырая масса листьев практически не менялась в течение суток и более (данные не приводятся).

Кислотность клеточного сока и содержание малата. Одним из основных индикаторов функционирования САМ-фотосинтеза служат циклические изменения кислотности клеточного сока листьев растений, связанные с суточной динамикой накопления и утилизации органических кислот. Исследования титруемой кислотности (ТК) клеточного сока листьев *H. triphyllum* в разные годы и периоды вегетации позволили выявить сезонные и суточные изменения величины этого показателя (рис. 1, табл. 3). Из представленных на рис. 1 данных видно, что уровень ТК значительно повышался во второй половине вегетации (июль–август). В этот период были отмечены и более значительные суточные изменения величины ТК. Так, в июле (фаза массового цветения) кислотность клеточного сока в ранние утренние часы достигала 96 мкмоль  $[\text{H}^+]/\text{г}$  сырой массы, к полудню она снижалась в 5 раз, а к ночи вновь заметно возрастала до 27 мкмоль  $[\text{H}^+]/\text{г}$  сырой массы. В конце мая (фаза вегетативного роста) величина ТК не превышала 6 мкмоль  $[\text{H}^+]/\text{г}$  сырой массы и была стабильна в течение суток. Сходные законо-

мерности изменения кислотности клеточного сока в период генеративного развития растений были отмечены и в другие годы (табл. 3). При этом более выраженная динамика величины ТК была зарегистрирована в более теплом 2016 г., чем в 2018 г.

Суточные изменения кислотности клеточного сока в фазу цветения соответствовали динамике содержания малата (табл. 4). Максимальное накопление малата зарегистрировано в ранние утренние часы, в полуденное время его содержание было в 6.5 раз меньше. К ночи концентрация малата вновь повышалась, но не достигала величин, отмеченных в ранние утренние часы. Содержание других карбоновых кислот изменялось в той же манере, что и малата, однако их концентрация была существенно меньше. Следовательно, их вклад в кислотность клеточного сока листьев, по сравнению с малатом, незначительный.

**Активность ФЕП-карбоксилазы.** ФЕП-карбоксилаза является ключевым ферментом, осуществляющим первичную фиксацию углекислоты у растений с САМ и С4-типом фотосинтеза. Мы исследовали активность фермента в листьях *H. triphyllum* в фазу вегетативного роста (май) и в период цветения (июль) (рис. 2). Листья отрастающих побегов характеризовались низким и стабильным в течение суток уровнем активности ФЕП-карбоксилазы. В фазу цветения активность ФЕП-карбоксилазы была в 4–7 раз выше и изменялась в течение суток. В начале ночи уровень активности ФЕП-карбоксилазы был в 1.5 раза выше, чем в ранние утренние часы. При этом повышение активности фермента



**Рис. 1.** Суточные изменения титруемой кислотности клеточного сока листьев *Hylotelephium triphyllum* в разные периоды вегетации (данные 2017 г.): 1 — 25–27 мая, 2 — 19–22 июня, 3 — 18–21 июля, 4 — 14–15 августа. Различные латинские буквы обозначают статистически значимые изменения величины показателя в течение суток ( $P \leq 0.95$ ).

наблюдалось уже в полуденное время, на фоне снижения пула органических кислот.

**Содержание растворимых сахаров.** В период генеративного развития растений содержание растворимых углеводов в листьях *H. triphyllum* суще-

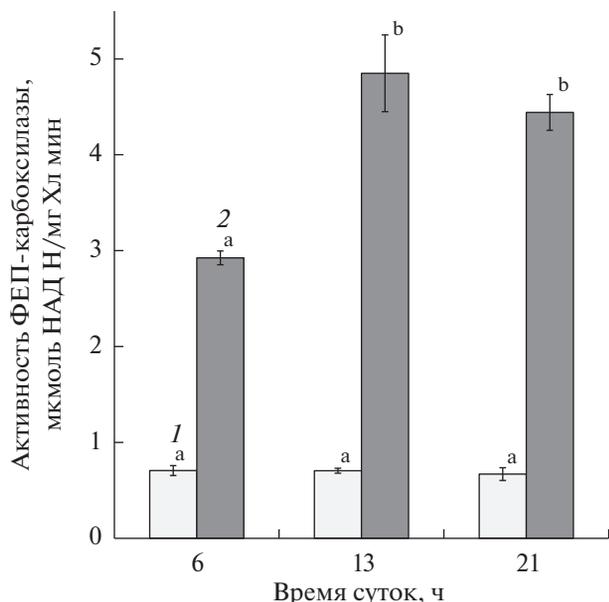
**Таблица 3.** Суточная динамика титруемой кислотности (мкмоль  $[H^+]$ /г сырой массы) клеточного сока листьев *Hylotelephium triphyllum* в период генеративного развития растений

Время суток, ч	2016 г.		2018 г.	
	2 июля	27 июля	3 июля	30 июля
6:00	84.8 ± 4.2 <sup>a</sup>	156.5 ± 7.6 <sup>a</sup>	43.5 ± 1.3 <sup>a</sup>	77.3 ± 2.6 <sup>a</sup>
12:00	15.3 ± 1.1 <sup>b</sup>	26.8 ± 2.0 <sup>b</sup>	29.1 ± 1.7 <sup>b</sup>	53.1 ± 5.2 <sup>b</sup>
18:00	13.9 ± 1.3 <sup>b</sup>	16.1 ± 0.9 <sup>c</sup>	15.1 ± 1.0 <sup>c</sup>	20.5 ± 1.1 <sup>c</sup>
22:00	31.8 ± 2.6 <sup>c</sup>	30.4 ± 1.9 <sup>b</sup>	27.9 ± 2.4 <sup>b</sup>	21.8 ± 3.2 <sup>c</sup>

Примечание. Различные надстрочные буквы обозначают статистически значимые изменения величины показателя в течение суток.

**Таблица 4.** Суточная динамика содержания карбоновых кислот (мкмоль/г сырой массы) и титруемой кислотности клеточного сока (мкмоль  $[H^+]$ /г сырой массы) в листьях *Hylotelephium triphyllum*, (данные 18–20 июля 2017 г.)

Время суток, ч	Малат	Цитрат + изоцитрат	Сукцинат	Титруемая кислотность
6:00	35.6 ± 1.8 <sup>a</sup>	5.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	96.2 ± 4.2 <sup>a</sup>
12:00	5.4 ± 0.1 <sup>b</sup>	2.0 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>b</sup>	16.9 ± 2.0 <sup>b</sup>
21:00	12.7 ± 0.2 <sup>c</sup>	2.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.7 ± 0.1 <sup>b</sup>	28.2 ± 1.8 <sup>c</sup>



**Рис. 2.** Суточная динамика активности ФЕП-карбоксилазы в листьях *Hylotelephium triphyllum*: 1 – май 2019 г., 2 – август 2018 г. Различные латинские буквы обозначают статистически значимые изменения величины показателя в течение суток ( $P \leq 0.95$ ).

ственно изменялось в течение суток (рис. 3). Максимум накопления сахаров отмечали во второй половине дня. При этом в начале июля (начало цветения) фонд сахаров в дневные часы был в 1.5 раза больше, чем в начале августа (начало пло-

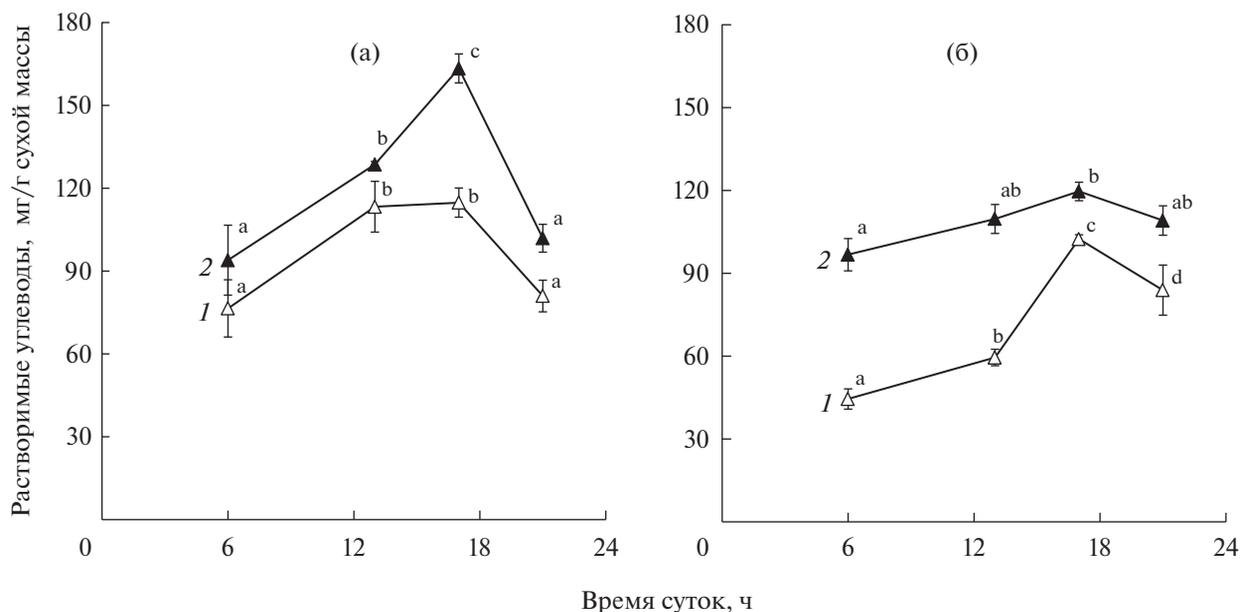
доношения). В оба срока в фонде углеводов, как правило, доминировали моносахара, их доля составляла в среднем 70%. Дисахариды были представлены в основном сахарозой. В составе моносахаров присутствовали седогептулоза (около 60%), фруктоза (35–40%) и глюкоза (менее 5%) (рис. 4).

Таким образом, нами установлено, что с переходом к генеративному развитию в листьях *H. triphyllum* повышается кислотность клеточного сока, увеличивается содержание малата, возрастает уровень активности ФЕП-карбоксилазы. В фазу цветения наблюдаются выраженные суточные изменения этих показателей. Фаза цветения приходится на наиболее теплый период вегетации (июль).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Факультативный САМ используют однолетние и многолетние растения, которые в условиях достаточного водоснабжения реализуют  $C_3$ -тип фотосинтеза для поддержания высокой скорости роста. При неблагоприятных воздействиях (дефицит влаги, высокие температуры, засоление) такие виды переходят на САМ. Индукция САМ служит механизмом снижения потери влаги и поддержания фотосинтетической активности. По имеющимся в литературе данным переход на САМ позволяет экономить до 70% воды, теряемой при транспирации за день [10].

Известно, что САМ-тип фотосинтеза связан с суточной ритмикой органических кислот. Зако-



**Рис. 3.** Содержание растворимых углеводов в фазе начала цветения (а) и начала плодоношения (б) в листьях *Hylotelephium triphyllum* (данные 2 июля и 3 августа 2018 г., соответственно): 1 – моносахариды, 2 – сумма растворимых сахаров. Различные латинские буквы обозначают статистически значимые изменения величины показателя в течение суток ( $P \leq 0.95$ ).

номерные суточные изменения кислотности клеточного сока и содержания малата в листьях *H. triphyllum* наблюдались нами в период генеративного развития (рис. 1; табл. 3, 4). Переход к генеративному развитию отмечен в конце июня, а фаза массового цветения приходилась на середину июля – месяца с наиболее теплой погодой. В период отрастания побегов (май) кислотность клеточного сока была низкой и постоянной в течение суток. Мы проанализировали зависимость величины, характеризующей разность между максимальными и минимальными за сутки значениями показателя титруемой кислотности клеточного сока ( $\Delta$  ТК), от погодных условий июня–июля. Выявлено, что величины  $\Delta$  ТК, полученные в разные годы и сроки вегетации, зависели достоверно от суммы активных температур ( $>15^\circ\text{C}$ ) за период (20 суток), предшествующий дате изучения суточной динамики ТК (рис. 5). Чем больше тепла получала растения, тем сильнее была выражена суточная динамика титруемой кислотности и больше величина  $\Delta$  ТК. В то же время количество выпавших осадков не оказало значимого влияния на величину  $\Delta$  ТК (данные не приводятся), вероятно, из-за низкой способности дерново-слоистой песчано-супесчаной почвы удерживать влагу. Несмотря на осадки, в июле нами было отмечено снижение содержания влаги в корнеобитаемом слое почвы до 10–15% полной влагоемкости. В результате уменьшилась оводненность и увеличился водный дефицит листьев (табл. 2).

Регуляция САМ-фотосинтеза в течение суток связана с суточным ритмом активности ФЕП-карбоксилазы. Считается, что активная (нечувствительная к накоплению малата) форма фермента присутствует у САМ-растений ночью [11]. Однако у некоторых САМ-видов ФЕП-карбоксилаза может оставаться активной в течение нескольких часов после начала фотопериода. Например, у  $\text{C}_3$ -САМ-вида *Clusia minor* она была активной (фосфорилированной) еще в течение 3 ч после включения света [12].

У исследованных нами растений *H. triphyllum* активность ФЕП-карбоксилазы в ранние утренние часы была почти вдвое ниже, чем в начале ночи. Причем повышение уровня активности фермента начиналось уже в первой половине дня. Известно, что фотопериод, интенсивность и спектральный состав светового потока могут оказывать существенное влияние на индукцию САМ посредством увеличения синтеза ФЕП-карбоксилазы и модуляции активности фермента [13, 14]. Анализируя суточные изменения активности фермента в листьях *H. triphyllum*, следует учитывать особенности светового режима, связанные с географическим положением района проведения исследований и, в первую очередь, продолжительность фотопериода. Так, в середине июля восход солнца наблюда-

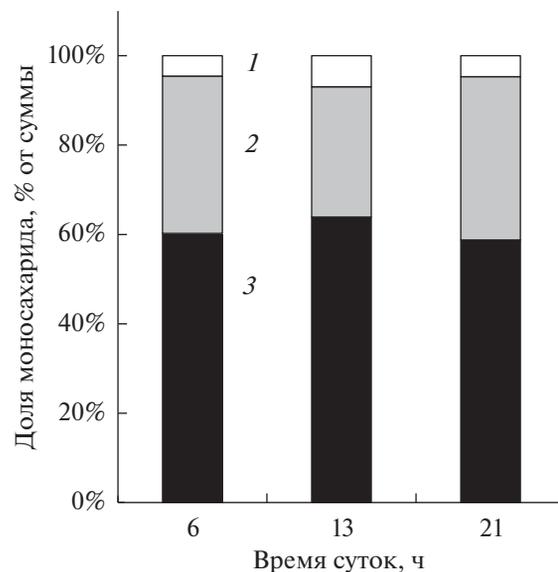


Рис. 4. Относительная доля моносахаридов в листьях *Hylotelephium triphyllum* в фазу массового цветения (18–20 июля 2017 г.): 1 – глюкоза, 2 – фруктоза, 3 – седогеаптулоза.

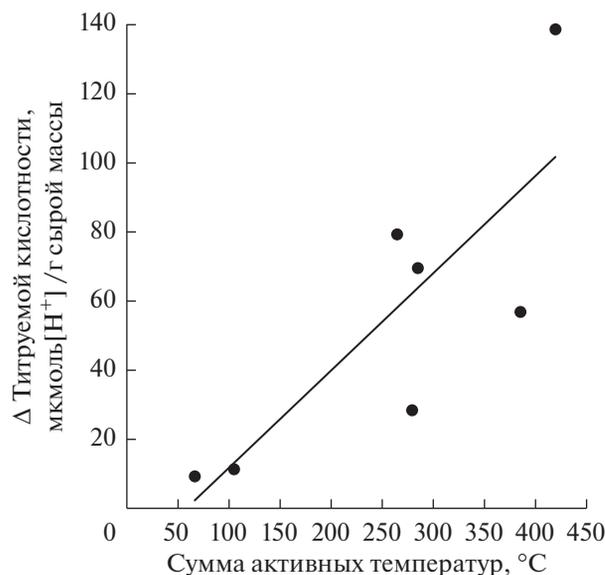


Рис. 5. Зависимость разности между максимальной и минимальными величинами титруемой кислотности клеточного сока ( $\Delta$  ТК) листьев *Hylotelephium triphyllum* от суммы активных температур выше  $15^\circ\text{C}$  за 20-суточный период, предшествующий дате определений суточной динамики титруемой кислотности (обобщенные данные за июнь–июль 2016–2019 гг.). Результаты корреляционного анализа: коэффициент корреляции Пирсона  $r = 0.811$ , уровень значимости  $P = 0.027$ .

ется в 2 ч 23 мин, заход в 21 ч 04 мин, а сумерки длятся более 2 ч.

Ранее было показано, что в листьях *H. triphyllum* отсутствует специализированная водозапаса-

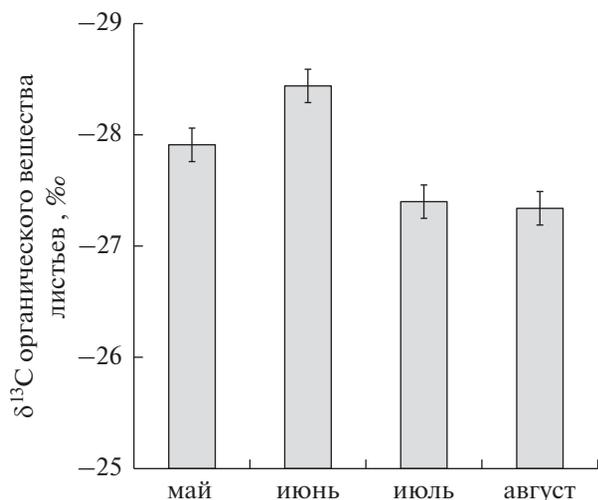


Рис. 6. Сезонные изменения величины  $\delta^{13}\text{C}$  органического вещества листьев *Hylothelephium triphyllum* (данные 2017 г.)

ющая ткань [6, стр. 31–32] и они характеризуются высокой водоудерживающей способностью. Этому способствует накопление осмотически активных соединений – растворимых сахаров и органических кислот.

Растворимые сахара играют важную роль во всех процессах жизнедеятельности, поскольку могут действовать как сигнальные молекулы, контролирующие экспрессию генов, которые регулируют метаболизм, развитие и устойчивость растений к стрессу [15]. Поэтому углеводный статус может иметь особое значение для видов с факультативным САМ. Наши данные свидетельствуют о сравнительно высоком содержании в листьях растений *H. triphyllum* растворимых сахаров, преимущественно моносахаридов, отличающихся наибольшей биологической активностью. Среди моносахаридов доминировала седогептулоза. О способности некоторых видов САМ-растений накапливать этот сахар известно давно, однако роль седогептулозы до конца не выяснена [16]. Полагают, что синтез седогептулозы связан с цитозольным окислительным пентозофосфатным путем и она участвует в поддержании углеродного и фосфорного гомеостаза в клетке при повышенной концентрации  $\text{CO}_2$ .

Несмотря на многочисленные исследования, все еще остаются плохо понятыми механизмы восприятия и трансдукции сигнала, формирования адекватного биохимического ответа САМ-растений [17, 18]. Не ясно, в какой мере эти механизмы универсальны для всех видов с факультативным САМ. У отдельных видов индукция САМ связана с онтогенетическим развитием. Следовательно, в регуляции экспрессии САМ генов могут участвовать гормоны, циркадные ритмы и другие факторы,

способные синхронизировать онтогенетические события в соответствии с изменениями во внешней среде. Онтогенетически запрограммированную индукцию  $\text{C}_3$ -САМ перехода можно рассматривать как способ обеспечения положительного баланса углерода и ресурсов для репродукции при предсказуемом ухудшении водоснабжения [4, 19]. У исследованного нами *H. triphyllum* выраженное функционирование САМ-пути наблюдалось в период генеративного развития и коррелировало с поступлением тепла на фоне снижения влагообеспеченности растений.

Для оценки вклада САМ в продукционный процесс мы определяли соотношение стабильных изотопов углерода ( $\text{C}^{12}/\text{C}^{13}$ ) в биомассе различных органов *H. triphyllum*. Как известно, фракционирование изотопов углерода при фотосинтезе в сильной степени зависит от биохимического механизма связывания углерода и существенно отличается у видов с различными типами фиксации атмосферного  $\text{CO}_2$  [20]. У растений с  $\text{C}_3$ -типом углеродного метаболизма величина изотопной дискриминации ( $\delta^{13}\text{C}$ ) варьирует в пределах от  $-21$  до  $-35\text{‰}$ , а у  $\text{C}_4$ -видов от  $-18$  до  $-9\text{‰}$ . Промежуточную позицию занимают растения с САМ-типом углеродного метаболизма. Если величина  $\delta^{13}\text{C}$  органического вещества листьев составляет  $-30\text{‰}$ – $-25\text{‰}$ , можно говорить о минимальном вкладе  $\beta$ -карбоксилирования ФЕП в общий углеродный баланс [21, 22].

Величина  $\delta^{13}\text{C}$  органического вещества листьев *H. triphyllum* варьировала в пределах от  $-27.3$  до  $-28.4\text{‰}$  (рис. 6). Обогащение пула углерода легким изотопом в первой половине вегетации (май–июнь) обусловлено тем, что растения находятся в благоприятных для роста условиях и фотосинтетическая ассимиляция углерода осуществляется по  $\text{C}_3$ -пути. Интенсивному росту способствуют длинный день и достаточное количество влаги в почве после половодья. Во второй половине вегетации (июль–август) отмечено небольшое повышение содержания в листьях тяжелого изотопа, что связано с индукцией САМ. В период плодоношения (середина августа) величина  $\delta^{13}\text{C}$  органического вещества генеративных органов составляла  $-27.9\text{‰}$ , стеблей  $-27.5\text{‰}$ , почек возобновления  $-27.4\text{‰}$  и утолщенных придаточных корней  $-27.3\text{‰}$ . Тот факт, что величина  $\delta^{13}\text{C}$  утолщенных придаточных корней была наименее отрицательна, указывает на возможность аллокации углерода, ассимилированного при САМ-фотосинтезе в запасные органы. Использование запасных веществ для формирования надземной биомассы побегов можно объяснить тенденцию к обогащению органического вещества листьев тяжелым изотопом углерода в период весеннего отрастания (май). Вместе с тем нельзя исключить влияние постфотосинтетических процессов фракционирования изотопов углерода, которые также

приводят к изменению сигнатуры изотопного состава органического вещества подземных органов относительно  $\delta^{13}\text{C}$  листьев [23].

Вопрос о том, насколько точно величина  $\delta^{13}\text{C}$  отражает вклад ночной и дневной фиксации  $\text{CO}_2$  у САМ-растений, остается дискуссионным [24]. Поэтому судя только по величине  $\delta^{13}\text{C}$  трудно оценить роль ассимиляции  $\text{CO}_2$  посредством  $\beta$ -карбоксилирования ФЕП в углеродном балансе  $\text{C}_3$ -САМ вида *H. triphyllum*. Обогащение биомассы *H. triphyllum* легким изотопом углерода подтверждает, что в природных условиях таежной зоны растения в большей мере использовали  $\text{C}_3$ -тип фотосинтетического метаболизма, чем САМ-путь.

Итак, нами выявлена сезонная и суточная динамика показателей, служащих индикаторами  $\text{C}_3$ -САМ перехода. Закономерные изменения кислотности клеточного сока, содержания малата и активности ФЕП-карбоксилазы в листьях свидетельствуют об индукции САМ у растений *H. triphyllum* в период генеративного развития. Установлено, что САМ-фотосинтез не вносит существенного вклада в углеродный баланс и продуктивность растений. Функционирование САМ в период цветения – плодоношения способствует сохранению фотосинтетического аппарата и реализации репродуктивного потенциала растений, обитающих на легко теряющих влагу песчано-супесчаных почвах в условиях гумидного климата таежной зоны европейского Северо-Востока России.

Работа выполнена в рамках темы госбюджетных НИОКТР “Физиология и стресс-устойчивость фотосинтеза растений и пойкилогидрических фотоавтотрофов в условиях Севера” (№ АААА-А17-117033010038-7).

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. *Silvera K., Neubig K.M., Whitten W.M., Williams N.H., Winter K., Cushman J.C.* Evolution along the crassulacean acid metabolism continuum // *Funct. Plant Biol.* 2010. V. 37. P. 995. <https://doi.org/10.1071/FP10084>
2. *Raven J.A., Spicer R.A.* The evolution of crassulacean acid metabolism // *Crassulacean acid metabolism. Biochemistry, ecophysiology and evolution* / Eds. Winter K., Smith J.A.C. Berlin: Springer-Verlag, 1996. P. 360.
3. *Keerle J.E., Rundel P.W.* Evolution of CAM and  $\text{C}_4$  carbon-concentrating mechanisms // *Int. J. Plant Sci.* 2003. V. 164. P. 55. <https://doi.org/10.1086/374192>
4. *Dodd A.N., Borland A.M., Haslam R.P., Griffiths H., Maxwell K.* Crassulacean acid metabolism: plastic, fan-tastic // *J. Exp. Bot.* 2002. V. 53. P. 569. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.369.569>
5. *Головки Т.К., Далькэ И.В., Бачаров Д.С., Бабак Т.В., Захожий И.Г.* Толстянковые в холодном климате. СПб.: Наука, 2007. 205 с.
6. *Golovko T.K., Dalke I.V., Bacharov D.S.* Mesostructure and activity of photosynthetic apparatus for three crassulacean species grown in cold climate // *Russ. J. Plant Physiol.* 2008. V. 55. P. 603. <https://doi.org/10.1134/S1021443708050038>
7. *Brushwood D.E.* Modification of the potassium ferricyanide reducing sugar test for sugars from extracts of cotton fiber // *J. Cotton Sci.* 2000. V. 4. P. 202
8. *Theng V., Agarie S., Nose A.* Regulatory properties of phosphoenolpyruvate carboxylase in crassulacean acid metabolism plants: diurnal changes in phosphorylation state and regulation of gene expression // *Plant Prod. Sci.* 2007. V. 10. P. 171. <https://doi.org/10.1626/pp.s.10.171>
9. Методика измерений массовой доли пигментов спектрофотометрическим методом (фиксация и экстракция диметилкетонном). Свидетельство об аттестации методики измерений № 88-17641-077-01.00076-2014. 2014. Сыктывкар. 24 с.
10. *Borland A.M.* A model for the partitioning of photosynthetically fixed carbon during the  $\text{C}_3$ -CAM transition in *Sedum telephium* // *New Phytol.* 1996. V. 134. P. 433. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1996.tb04360.x>
11. *Carter P.J., Fewson C.A., Nimmo G.A., Wilkins M.B.* Roles of circadian rhythms, light and temperature in the regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in crassulacean acid metabolism // *Crassulacean acid metabolism. Biochemistry, ecophysiology and evolution* / Eds. Winter K., Smith J.A.C. Berlin: Springer-Verlag, 1996. P. 46.
12. *Borland A.M., Griffiths H.* A comparative study on the regulation of  $\text{C}_3$  and  $\text{C}_4$  carboxylation processes in the constitutive crassulacean acid metabolism (CAM) plants *Kalanchoe daigremontiana* and the  $\text{C}_3$ -CAM intermediate *Clusia minor* // *Planta.* 1997. V. 201. P. 368 <https://doi.org/10.1007/s004250050079>
13. *Cockburn W., Whitelam G. C., Broad A., Smith J.* The participation of phytochrome in the signal transduction pathway of salt stress responses in *Mesembryanthemum crystallinum* L. // *J. Exp. Bot.* 1996. V. 47. P. 647. <https://doi.org/10.1093/jxb/47.5.647>
14. *Gawronska K., Romanowska E., Miszalski Z., Niewiadomska E.* Limitation of  $\text{C}_3$ -CAM shift in the common ice plant under high irradiance // *J. Plant Physiol.* 2013. V. 170. P. 129. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.09.019>
15. *Ceusters N., van den Ende W., Ceusters J.* Exploration of sweet immunity to enhance abiotic stress tolerance in plants: lessons from CAM // *Progress in Botany Vol. 78* / Eds. Cánovas F., Lüttge U., Matyssek R. Cham: Springer, 2016. P. 145. [https://doi.org/10.1007/124\\_2016\\_1](https://doi.org/10.1007/124_2016_1)
16. *Ceusters J., Godts C., Peshev D., Vergauwen R., Dyubankova N., Lescrinier E., De Proft M.P., Van den Ende W.* Sedoheptulose accumulation under  $\text{CO}_2$  enrichment in leaves of *Kalanchoë pinnata*: a novel mechanism to enhance C and P homeostasis? // *J. Exp. Bot.* 2013.

- Vol. 64. P. 1497.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/ert010>
17. *Cushman J.C., Taybi T., Bohnert H.J.* Induction of crassulacean acid metabolism – molecular aspects // Photosynthesis. Advances in photosynthesis and respiration, V 9. / Eds. Dordrecht: Springer, 2000. P. 551.
  18. *Winter K., Holtum J.A.M.* Facultative crassulacean acid metabolism (CAM) plants: powerful tools for unraveling the functional elements of CAM photosynthesis // J. Exp. Bot. 2014. V. 65. P. 3425.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/eru063>
  19. *Herppich W., Herppich M., Dieter J.W.* The irreversible C<sub>3</sub> to CAM shift in well-watered and salt-stressed plants of *Mesembryanthemum crystallinum* is under strict ontogenetic control // Bot. Acta. 1992. V. 105. P. 34.  
<https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1992.tb00264.x>
  20. *Farquhar G.D., Ehleringer J.R., Hubick K.T.* Carbon isotope discrimination and photosynthesis // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1989. V. 40. P. 503.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.pp.40.060189.002443>
  21. *Brugnoli E., Farquhar G.D.* Photosynthetic fractionation of carbon isotopes // Photosynthesis. Advances in photosynthesis and respiration, V. 9. / Eds. Leegood R.C., Sharkey T.D., Caemmerer S. Dordrecht: Springer, 2000. P. 399.
  22. *Griffiths H.* Carbon isotope discrimination and the integration of carbon assimilation pathways in terrestrial CAM plants // Plant Cell Environ. 1992. V. 15. P. 1051.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1992.tb01655.x>
  23. *Badeck F.W., Tcherkez G., Nogués S., Piel C., Ghashghaie J.* Post-photosynthetic fractionation of stable carbon isotopes between plant organs – a widespread phenomenon // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2005. V. 19. P. 1381.  
<https://doi.org/10.1002/rcm.1912>
  24. *Winter K., Holtum J.A.M.* How closely do the  $\delta^{13}$  values of crassulacean acid metabolism plants reflect the proportion of CO<sub>2</sub> fixed during day and night? // Plant Physiol. 2002. V. 129. P. 1843.  
<https://doi.org/10.1104/pp.002915>

## РОСТ КУЛЬТУРЫ *Porphyridium purpureum* (Porphyridiales, Rhodophyta) И ПРОДУКЦИЯ В-ФИКОЭРИТРИНА ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ОСВЕЩЕННОСТИ

© 2021 г. И. Н. Гудвилович<sup>а, \*</sup>, А. С. Лелеков<sup>а</sup>, Е. И. Мальцев<sup>б</sup>,  
М. С. Куликовский<sup>б</sup>, А. Б. Боровков<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр  
“Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского Российской академии наук”, Севастополь, Россия

<sup>б</sup>Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: gudirina2008@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.04.2020 г.

После доработки 25.04.2020 г.

Принята к публикации 25.04.2020 г.

Красный пигмент В-фикоэритрин (В-ФЭ), относящийся к группе фикобилипротеинов (ФБП), входит в состав светособирающего пигментного комплекса красной микроводоросли *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross, а его количество в клетках определяется уровнем облучённости и обеспеченности азотом. С практической точки зрения, В-ФЭ является ценным природным пигментом, биотехнологический потенциал которого используется в нутрицевтике, фармацевтике, пищевой и косметической промышленности, а также в биомедицинских исследованиях и клинической диагностике. В экспериментах с *P. purpureum* довольно часто оценивают динамику численности клеток и содержание фотосинтетических пигментов, однако в большинстве экспериментов плотность культуры невысока, хотя известно, что у данного вида она может достигать 10 г/л сухого вещества. В связи с вышеизложенным, целью данной работы являлось изучение особенностей накопления и продукции ФБП в плотной культуре *P. purpureum* при различной освещенности. Проведенный молекулярно-генетический анализ подтвердил таксономическую принадлежность культуры *P. purpureum*. Водоросли выращивали в фотобиореакторах плоскопараллельного типа при средней освещённости 5, 10 и 15 кЛк. При исследовании микроводоросли *P. purpureum* в качестве показателей использовали динамику плотности культуры, содержание В-ФЭ и продукционные характеристики. Показано, что прирост плотности культуры микроводоросли, соответствующий расчетной концентрации азота в питательной среде, получен только для варианта с освещенностью 5 кЛк. Увеличение освещённости до 10 и 15 кЛк вызывало снижение как максимальной, так и средней продуктивности культуры в 2.5–3.5 раза. Экспериментально установлено, что самое высокое содержание В-ФЭ в клетках и культуре *P. purpureum* (5.5% сухого вещества и 74 мг/л соответственно) наблюдалось при освещённости 5 кЛк. Определен характер изменения содержания В-ФЭ в культуре *P. purpureum* в зависимости от удельной освещенности клеток микроводоросли: концентрация пигмента гиперболически снижалась с ростом удельной освещенности. Таким образом, уровень освещённости клеток микроводоросли *P. purpureum* оказывал значительное влияние на ростовые характеристики культуры (скорость роста, скорость синтеза и выход В-ФЭ): более низкий уровень поверхностной освещённости являлся предпочтительным для выращивания *P. purpureum*. Подход, предложенный в работе, позволяет снизить материальные затраты при культивировании *P. purpureum* с сохранением высокой скорости роста культуры.

**Ключевые слова:** *Porphyridium purpureum*, фикобилипротеины, освещенность, пигменты, В-фикоэритрин, скорость роста

**DOI:** 10.31857/S0015330320060056

### ВВЕДЕНИЕ

За последние десятилетия была показана высокая биологическая ценность веществ, синтези-

руемых в клетках микроводорослей, таких как: пигменты, липиды и углеводы [1–3]. Именно благодаря этому биотехнология микроводорос-

**Сокращения:** АФЦ – пигмент аллофикоцианин; БАД – биологически активные добавки; В-ФЭ – красный пигмент В-фикоэритрин; ССК – светособирающий пигментный комплекс; ФБП – фикобилипротеин; ВІ – Байесовский подход (от Bayesian inference); LB – значение бутстрэп для ML (от likelihood bootstrap); ML – метод максимального правдоподобия (от maximum likelihood); PP – апостериорная вероятность (от posterior probability); R-ФЦ – пигмент R-фикоцианин.

лей получила новое направление развития, когда выращивание осуществляют для получения биологически активных компонентов биомассы. Высокая ценность и востребованность таких пигментов, как хлорофиллы, каротиноиды и фикобилипротеины, позволила поставить вопрос о промышленном получении натуральных пигментов из микроводорослей [4–6].

Одноклеточная красная микроводоросль *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross привлекает внимание исследователей широким спектром синтезируемых веществ различной природы. С прикладной точки зрения эта микроводоросль, в первую очередь, представляет интерес как источник сульфатированных экзополисахаридов, эссенциальных жирных кислот, а также пигментов, относящихся к группе фикобилипротеинов (ФБП), которые у красных водорослей входят в состав фикобилисом [2, 3, 5, 7–9]. Все это, а также отсутствие данных о наличии токсичных веществ в биомассе *P. purpureum*, позволяет использовать продукты синтеза в качестве биологически активных добавок (БАД), а отсутствие целлюлозной клеточной стенки значительно облегчает и удешевляет процесс извлечения ценных компонентов [1, 2, 5, 8, 10, 11].

Использование натуральных природных пигментов приобретает все большее значение для косметологии, фармакологии и производства продуктов питания. Доказано, что пигменты микроводорослей оказывают выраженное положительное влияние на организм человека, обладая антиоксидантным, антиканцерогенным, противовоспалительным действием, а также ангиоогенным и нейропротекторным эффектами. С практической точки зрения, ФБП являются ценными природными веществами, биотехнологический потенциал которых уже используется или перспективность которого показана при использовании в нутрицевтике, фармацевтике, пищевой и косметической промышленности, а также в биомедицинских исследованиях и клинической диагностике [1, 3, 4, 8, 9].

Известно, что биохимический состав и скорость роста культур микроводорослей отличается у разных видов и штаммов, при этом на выход ценных компонентов также оказывают влияние множество различных факторов, важнейшие из которых: тип и конструкция фотобиореактора, параметры культивирования (состав питательной среды, освещённость, условия аэрации, pH, температура и др.) [2, 4, 6, 7, 12, 13]. Свет является главным фактором среды, который определяет скорость протекания реакций фотосинтеза, излучение и спектральный состав могут изменить метаболизм и биохимический состав культур микроводорослей. В клетках микроводорослей свет поглощается светособирающими пигментными комплексами (ССК) и далее передается в реакционные центры первой ( $P_{700}$ ) и второй ( $P_{680}$ ) фото-

систем. Общая тенденция, представленная в литературе: микроводоросли с фикобилисомами, как правило, предпочитают низкую освещённость (~10–50 моль фотонов/(м<sup>2</sup> с)), в то время как многие другие виды водорослей, например, большинство динофлагеллят или зеленые, обычно нуждаются в более высокой интенсивности света (~60–100 моль фотонов/(м<sup>2</sup> с)) [3, 10, 14–17]. ФБП *Porphyridium* (В-фикоэритрин, R-фикоцианин и аллофикоцианин), входящие в состав ФС II, являются пигментами белковой природы, и их количество в клетках, в первую очередь, определяется уровнем облученности и обеспеченности азотом. Одним из наиболее изученных ФБП является В-фикоэритрин (В-ФЭ), входящий в состав ССК *P. purpureum* и придающий красную окраску его культуре [10, 15]. В экспериментах с *P. purpureum* довольно часто оценивают динамику численности клеток и содержание фотосинтетических пигментов [7–9, 11, 12, 18]. Однако в большинстве экспериментов плотность культуры невысока, хотя известно, что у данного вида она может достигать и 10 г/л сухого вещества [10].

В связи с вышеизложенным, целью данной работы являлось изучение особенностей накопления и продукции ФБП в плотной культуре *P. purpureum* при различной освещённости.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполнялись на базе Отдела биотехнологий и фиторесурсов ФИЦ ИнБЮМ (г. Севастополь). Объектом исследования являлся штамм IBSS-70 красной микроводоросли *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross (Rhodophyta) из коллекции Научно-образовательного центра коллективного пользования ФИЦ ИнБЮМ “Коллекция гидробионтов Мирового океана”.

Выращивание осуществляли на питательной среде для морских красных водорослей [15]: (состав:  $\text{NaNO}_3$  – 1.2 г/л,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.45 г/л,  $\text{EDTA-Na}_2$  – 0.037 г/л,  $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  – 0.0265 г/л,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 0.004 г/л,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0.0031 г/л,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 0.0009 г/л,  $\text{K}_2\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 0.0017 г/л). Среду готовили на стерилизованной морской воде.

Культуру *P. purpureum*, которая была использована в качестве инокулята, предварительно выращивали в фотобиореакторах плоскопараллельного типа при освещённости 5 кЛк. Далее, культивирование продолжили в фотобиореакторах того же типа с рабочим объемом 1 л и толщиной слоя 2 см при круглосуточном искусственном освещении. В качестве осветителя использовали световую решетку из 18 Вт люминесцентных ламп; средняя освещённость на поверхности фотобиореакторов составляла 5, 10 и 15 кЛк. Интенсивность освещения на поверхности фотобиореактора регистри-

ровали при помощи люксметра Ю-116 с погрешностью не более 5% от измеряемой величины. Температуру поддерживали на уровне 26–28°C, рН среды – 8–9. Барботаж культур осуществляли аквариумным компрессором Hailea АСО-308 воздухом без дополнительного введения углекислого газа; скорость подачи воздуха была одинакова для фотобиореакторов и составляла около 0.5 л/л культуры в минуту. Барботаж осуществляли через аквариумный распылитель воздуха, представляющий собой пластиковую трубку длиной 5 см, диаметром 5 мм, у которой диаметр пор не превышает 0.1 мм.

Молекулярно-генетические исследования проводились на базе лаборатории молекулярной систематики водных растений ИФР РАН. ДНК исследуемого штамма IBSS-70 экстрагировали с помощью набора Helix™ (“Bio-Rad Laboratories”, США) в соответствии с протоколом производителя. Амплификацию баркодингового участка V4 ядерного гена 18S рДНК длиной 435 п.н. проводили с помощью пары праймеров D512 и D978 [19]. Условия амплификации: начальная денатурация – 5 мин при 95°C, последующие 35 циклов: денатурация при 94°C – 30 с, отжиг праймеров – 40 с при 52°C, элонгация – 50 с при 72°C; окончательное удлинение – 5 мин при 72°C.

Полученный ПЦР-продукт визуализировали методом горизонтального электрофореза в агарозном геле (1%) и окрашивали SYBR® Safe (“Life Technologies”, США). Очистку ПЦР-продукта проводили смесью FastAP, 10× FastAP Buffer, Exonuclease I (“Thermo Fisher Scientific”, США) и воды.

Редактирование и сборку полученной консенсусной последовательности осуществляли путем сопоставления прямых и обратных хроматограмм при помощи программ Ridom TraceEdit (ver. 1.1.0) и Mega7. Нуклеотидные последовательности выравнивали с помощью программы Mafft v7, используя модель E-INS-i. После этого проводили окончательное выравнивание – визуально определяли и удаляли неспаренные участки в начале и в конце полученной матрицы. Общая длина выравнивания составила 464 п.н.

Филогенетические деревья строились методами максимального правдоподобия (ML) и Байеса (BI). Набор молекулярно-генетических данных анализировался с использованием байесовского метода, реализованного в программе Beast ver. 1.10.1. [20]. Для выравненной нуклеотидной матрицы наиболее подходящая модель нуклеотидных замен, параметр формы  $\alpha$  и доля неизменных сайтов (pinvar) оценивались с использованием байесовского информационного критерия (BIC) с помощью программы jModelTest 2.1.10 [21]. В качестве модели видообразования использовалось дерево-предшественник типа Yule. Расчет-

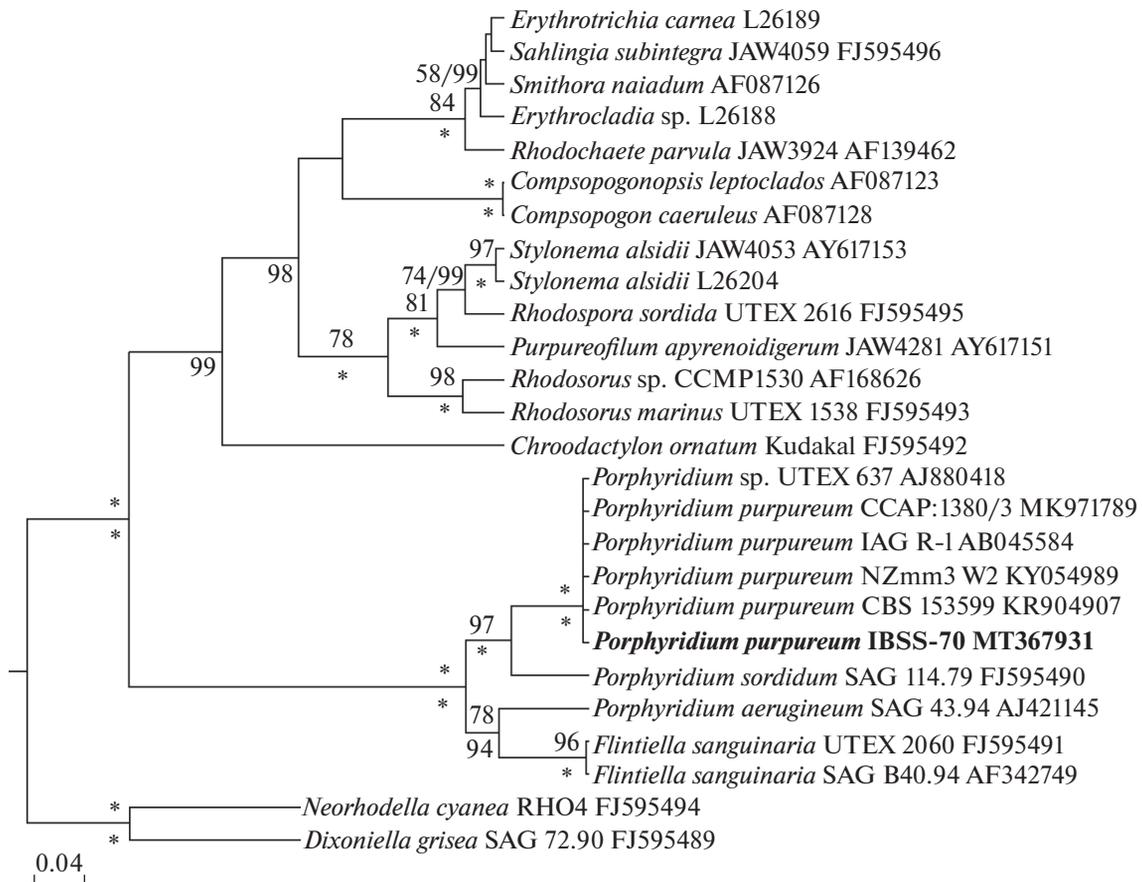
ная сходимость параметров, эффективный размер выборки (ESS) и период выгорания проверялись с помощью программы Tracer ver. 1.7.1. [20]. Байесовский анализ проводился со следующими параметрами: случайное начальное дерево, количество запусков – 2, число параллельных цепочек – 4, количество поколений –  $1 \times 10^7$ , запись параметров каждого поколения и параметр отжига – 25%. Деревья ML строили в онлайн программе RA×ML [22] с проверкой их устойчивости 1000 бутстреп-репликами. Просмотр и редактирование деревьев осуществляли в программах FigTree (ver. 1.4.2) и Adobe Photoshop CC (19.0).

Содержание сухого вещества в культуре определяли ежедневно весовым, а также фотометрическими методами [23]. Оптическую плотность культуры *P. purpureum* измеряли на фотометре Unicо 2100 в кюветах с рабочей длиной 5 мм. Пробы для определения содержания ФБП отбирали через 2–3 суток на различных фазах роста накопительной культуры после тщательного перемешивания. Суспензию культуры *P. purpureum*, полученную в эксперименте, центрифугировали в течение 10 мин, надосадочную жидкость сливали, осадённую биомассу использовали для определения ФБП. Количественное содержание ФБП определяли спектрофотометрическим методом [23]. Для этого проводили экстракцию биомассы *P. purpureum* фосфатным буфером (0.05 М; рН = 7–7.5). Спектры экстрактов пигментов проверяли на регистрирующем спектрофотометре СФ-2000 в диапазоне длин волн 400–800 нм с шагом 0.1 нм. Регистрировали оптическую плотность полученных экстрактов в области характеристических максимумов поглощения В-фикоэритрина (545 нм), R-фикоцианина (615 нм) и аллофикоцианина (650 нм), а также при 750 нм (для учета неспецифического поглощения раствора). Концентрацию пигментов в водном экстракте определяли по [15], используя значения оптической плотности для соответствующих длин волн.

Рассчитывали средние арифметические ( $\bar{x}$ ), стандартные отклонения (S), основные ошибки средних, доверительные интервалы для средних ( $\Delta\bar{x}$ ). Все расчеты проводили в программах Libre Office и Scidavis для уровня значимости  $\alpha = 0.05$ . В таблицах и на графиках представлены средние значения и рассчитанные доверительные интервалы ( $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ ) для трех повторностей. В некоторых случаях, чтобы избежать загромождения рисунков, доверительные интервалы на графиках не обозначены, а ошибка не превышала 10%.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проверка таксономического статуса исследуемого штамма IBSS-70 проводилась реконструкцией филогенетических связей методами макси-



**Рис. 1.** Байесовское филогенетическое дерево для штамма *Porphyridium purpureum* IBSS-70, сконструированное на основе анализа нуклеотидных последовательностей участка V4 18S рДНК для 26 представителей Rhodophyta. В качестве внешней группы выбраны представители порядка Dixoniellales. Общая длина выравнивания 464 п.н. Исследуемый штамм выделен жирным шрифтом. Для всех представителей указан номер штамма и номера доступа к последовательностям в GenBank. Над горизонтальными линиями показаны значения бутстрепа для ML-анализа (<50 не указаны), под горизонтальными линиями – значения Байесовских апостериорных вероятностей (<90 не указаны). \* обозначена 100% статистическая поддержка. Модель нуклеотидных замен НКУ+I+G,  $\alpha = 0.3770$  и  $\text{pinvar} = 0.2350$ .

мального правдоподобия (ML, где LB – значение бутстрепа) и Байеса (BI, где PP – апостериорная вероятность). Как и в предыдущих исследованиях, касающихся вопросов филогении красных водорослей [24, 25], все включенные в анализ последовательности *P. purpureum* образовали единую кладу с максимальной статистической поддержкой (LB 100, PP 100) (рис. 1). В состав этой клады вошел как штамм IBSS-70, так и наиболее часто используемые в филогении *Porphyridiophyceae* штаммы *P. purpureum* CCAP 1380/3, *Porphyridium* sp. UTEX 637, *P. purpureum* IAG R-1, *P. purpureum* NZmm3W2 и *P. purpureum* CBS 153599. Остальные виды красных водорослей, содержащиеся в выборке, разбились на клады, соответствующие современному пониманию филогении Rhodophyta [24].

Начальная плотность культуры *P. purpureum* для всех вариантов эксперимента составляла около 0.5 г/л сухого вещества. За первые 5 суток выращивания прирост биомассы для варианта с самой

низкой поверхностной освещенностью составил 1.8 г/л сухого вещества, а для двух остальных вариантов – в 3 раза ниже (0.6 и 0.7 г/л сухого вещества соответственно). Таким образом, за 5 суток выращивания культуры *P. purpureum* ее плотность увеличилась в 2.4, 2.5 и 4.7 раза (при освещенности 15, 10 и 5 кЛк соответственно) (рис. 2).

По литературным данным для синтеза 1 г биомассы *P. purpureum* (при оптимальных условиях) с нормальным содержанием белка (40–50%) необходимо около 70 мг азота [10]. Поэтому возможный прирост биомассы *Porphyridium* за весь период выращивания по расчетам мог составить 2.0–2.4 г/л сухого вещества [10, 26]. Близкие к расчетным значения этого параметра (2.1 г/л сухого вещества) наблюдались только для варианта эксперимента с освещенностью 5 кЛк. При повышении освещенности наблюдаемый прирост был значительно ниже потенциально возможного (в 2.3 и 3.3 раза для 10 и 15 кЛк соответственно) (табл. 1).

При освещенности 5 кЛк максимальная и средняя продуктивность культуры *P. purpureum* на линейном участке роста, а также прирост биомассы были значительно выше (в среднем, в 2.5–3.5 раза), чем в вариантах с более высокой освещенностью. Увеличение освещенности вызывало снижение продуктивности культуры, что, в итоге, приводило к существенной потере урожая биомассы *P. purpureum*. В большинстве случаев при интенсивном выращивании микроводорослей факторами, ограничивающими рост культуры, являются освещенность и обеспеченность элементами минерального питания клеток культуры. По литературным данным для выращивания *P. purpureum* предпочтительнее использовать более низкие освещенности [3, 10]. Ранее полученные данные показали возможность получения плотной культуры данного вида с продуктивностью около 0.5 г/(л сут) сухого вещества при поверхностной освещенности 20 кЛк, однако, в этом случае толщина рабочего слоя культуры была в 2.5 раза больше, чем в данном эксперименте [18]. По-видимому, увеличение поверхностной освещенности и, соответственно, удельной освещенности клеток, вызвало фотоингибирование роста культуры *P. purpureum*, даже при условии оптимальности прочих условий выращивания [10]. Кроме того, была отмечена коричневая окраска клеток культуры, наиболее интенсивная для варианта с максимальной освещенностью что, как правило, свидетельствует о нарушении процессов синтеза пигментов группы ФБП вследствие воздействия стрессовых условий.

Полученные данные свидетельствуют о негативном влиянии повышенного уровня облученности, нарушающего процессы биосинтеза ФБП в клетках культуры *P. purpureum*, несмотря на достаточное обеспечение элементами минерального питания (табл. 1).

В проведенном эксперименте некоторое лимитирование процессов роста и биосинтеза культуры *P. purpureum* начальной концентрацией азота в среде могло наблюдаться только для варианта с максимальной продукцией биомассы (5 кЛк) (табл. 1). О дефиците азота в среде в этом варианте также свидетельствовало наблюдаемое снижение содержания В-ФЭ в биомассе и в культуре *P. purpureum*

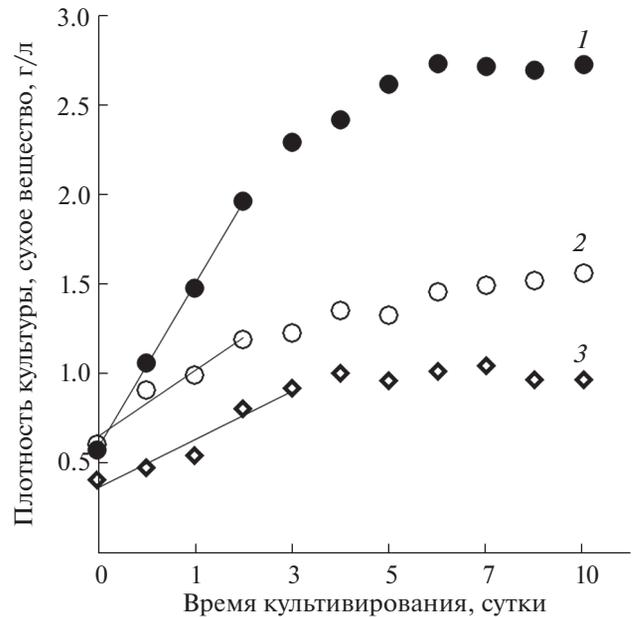


Рис. 2. Динамика плотности культуры *Porphyridium purpureum* при различной освещенности: (1) 5 кЛк; (2) 10 кЛк; (3) 15 кЛк.

*reum* (рис. 3) после 6-х суток и завершения стадии активного роста [3, 10].

За 3 суток накопительного культивирования изменение содержания В-ФЭ в клетках *P. purpureum* для всех вариантов эксперимента имело разнонаправленный характер: при освещенности 5 кЛк оно увеличилось в 1.9 раза, при 10 кЛк — существенно не изменилось, а при 15 кЛк — снизилось в 3.4 раза по сравнению с первоначальными значениями (рис. 3а). При дальнейшем выращивании содержание В-ФЭ в клетках *P. purpureum* продолжало повышаться только в условиях минимальной освещенности (5 кЛк); таким образом, за 6 суток концентрация пигмента выросла в 2.6 раза (рис. 3а). Последующее снижение содержания В-ФЭ в клетках *P. purpureum* для этого варианта после 6-х суток культивирования совпадает с переходом культуры на стадию замедления роста и стационарную (рис. 3). В соответствии с приведенными выше расчетами, концентрация азота в питательной среде, по-видимому, была исчерпа-

Таблица 1. Продукционные характеристики накопительной культуры *P. purpureum* при различной освещенности

Освещенность, кЛк	Количество азота в среде, мг/л	Прирост биомассы сухого вещества, г/л		Продуктивность, г/(л сут)	
		расчет	реальный	макс	средн. за 5 сут
5	150	2.4	2.1	0.46	0.37
10			0.9	0.18	0.15
15			0.6	0.13	0.12

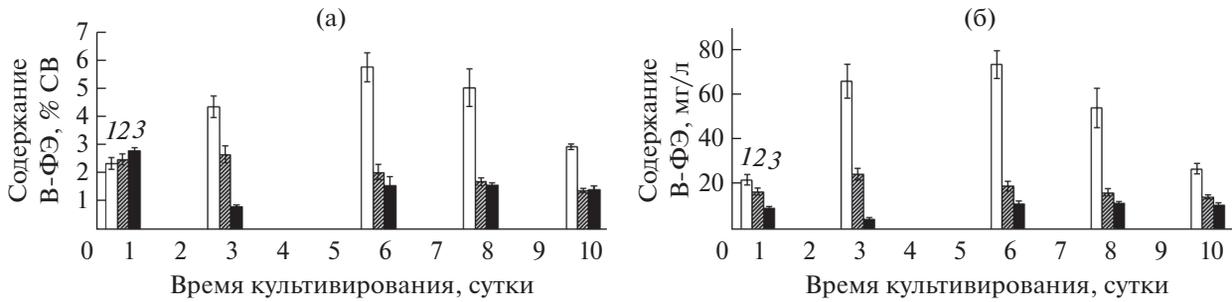


Рис. 3. Содержание В-фикоэритрина в клетках (а) и в культуре *P. purpureum* (б) при различной освещённости. (1) 5 кЛк; (2) 10 кЛк; (3) 15 кЛк.

на, что вызвало как остановку роста культуры, так и процессов синтеза ФБП.

После 3 суток выращивания *P. purpureum* содержание В-ФЭ (в клетках и в культуре) при 10 кЛк несколько снизилось и далее до окончания эксперимента оставалось стабильным. При освещённости 15 кЛк после значительного снижения содержания В-ФЭ к 3-м суткам наблюдалось его повышение в 2 раза с последующей стабилизацией до окончания эксперимента.

Динамика изменения В-ФЭ в культуре *P. purpureum*, в основном, совпадала с направленностью изменения содержания данного пигмента в биомассе микроводоросли. Наибольший рост концентрации пигмента также был зарегистрирован для варианта с освещённостью 5 кЛк: содержание В-ФЭ увеличилось в 3.3 раза с 1 по 6 сутки культивирования, достигнув 74 мг/л, что являлось максимальным для условий данного эксперимента (рис. 3б). Снижение В-ФЭ после перехода культуры *P. purpureum* на стадию замедления роста и стационарную отмечено многими исследователями и связано с исчерпанием азота в среде и наблюдающейся на этом фоне деградацией ФБП, представляющих собой белковые комплексы [3, 6, 27]. Следует отметить, что снижение содержания В-ФЭ, обусловленное азотным лимитированием, наблюдалось только для варианта с минимальной освещённостью. Для двух других вариантов, учитывая, что прирост биомассы составил 25 и 38% от расчетного (для вариантов 15 и 10 кЛк соответственно), характер изменения содержания данного пигмента, по-видимому, определялся не концентрацией элементов минерального питания в среде, а уровнем освещённости клеток культуры. Заданный в эксперименте уровень освещённости 10 и 15 кЛк, по-видимому, являлся завышенным и ингибировал как ростовые процессы, так и процессы синтеза ФБП. Признано, что содержание в клетках *P. purpureum* фотосинтетических пигментов, особенно В-ФЭ, ввиду его локализации в антеннах, может являться чувствительным индикатором уровня освещённости клеток [12, 16]. Снижение содержания В-ФЭ, входящего в светособираю-

щие комплексы ФС II, в клетках *P. purpureum* к 6-м суткам в вариантах эксперимента с повышенной освещённостью до крайне низких величин на фоне остановки роста культуры, указывает на серьезные нарушения процессов биосинтеза в клетках, что может приводить даже к гибели культуры [10].

Относительное содержание пигментов в клетках или биомассе микроводорослей является не только непостоянной величиной и может изменяться в десятки раз, но и характеризуется значительной нелинейностью в процессе роста культуры [28]. Ранее была предложена модель, которая позволяет прогнозировать динамику содержания пигментов, в том числе фикобилиновой природы, при культивировании микроводорослей с заданной внешней освещённостью [28]. Модель основана на предположении, что наблюдаемая скорость изменения концентрации пигмента является алгебраической суммой скоростей синтеза, фотодеградации и восстановления части фотоокисленных пигментов:

$$\beta = \beta_{st} + (\beta_0 - \beta_{st}) \times e^{-\mu_m t} (c \sin \sqrt{\mu_\pi \mu_i} t + \cos \sqrt{\mu_\pi \mu_i} t) \quad (1)$$

где  $\beta_{st}$  – стационарное значение относительного содержания пигмента,  $\beta_0$  – начальное содержание пигмента в клетках культуры микроводорослей,  $\mu_m$  – максимальная удельная скорость роста культуры микроводорослей,  $\mu_\pi$  – константа деградации или константа перехода пигмента в окисленное состояние,  $\mu_i$  – константа возбуждения или константа перехода пигмента из основного в возбужденное состояние, определяемая внешней освещённостью,  $c$  – константа, определяемая значениями  $\mu_\pi$ ,  $\mu_i$ ,  $\mu_m$ , а также  $t_{ext}$  – временем, соответствующим экстремуму функции.

Предлагаемая модель позволяет описать явление “ложного старта”, наблюдаемое при резком повышении освещённости клеток микроводорослей. В этом случае функция имеет явно выраженный минимум, который характеризуется параметрами  $\beta_{ext}$  и  $t_{ext}$  и совпадает с полученными экспериментальными данными (рис. 4).

Анализируя характер кривой, следует отметить, что на начальном этапе фотодеструктивное окисление В-ФЭ преобладает над его синтезом, поэтому величина  $\beta$  уменьшается. Момент запуска накопительной культуры *P. purpureum* сопровождается резким увеличением облученности, приходящейся на единицу биомассы. В таких условиях помимо изменения содержания пигментов происходит перестройка всего фотосинтетического аппарата клеток [13]. Высокое соответствие теоретических и экспериментальных данных ( $R^2 = 0.95$ ) позволяет сделать вывод о том, что именно при учете процессов фотодеструктивного окисления пигментов с возможностью их последующего восстановления можно объяснить явление так называемого “ложного старта” динамики относительного содержания В-ФЭ при резком изменении облученности клеток *P. purpureum*. Таким образом, предлагаемая модель может быть использована для прогнозирования динамики содержания пигментов при культивировании *P. purpureum* с заданной внешней освещенностью.

Известно, что продукция ФБП зависит как от скорости роста культуры, так и от содержания данных пигментов в клетках микроводоросли [7, 18]. Наибольшая продуктивность по В-ФЭ накопительной культуры *P. purpureum* зарегистрирована для варианта эксперимента с поверхностной освещенностью 5 кЛк (табл. 2).

Поскольку повышение поверхностной освещенности в 3 раза (от 5 до 15 кЛк) приводит к уменьшению как содержания В-ФЭ в клетках *P. purpureum*, так и скорости роста культуры в 3 раза, то и продуктивность по данному пигменту снижается более чем в 6 раз, что также свидетельствует об угнетении биосинтеза ФБП. В общем, характер изменения продуктивности культуры *P. purpureum* по В-ФЭ совпадал с таковым у ранее рассчитанных ростовых параметров: средняя наблюдаемая скорость синтеза В-ФЭ и суммарный выход данного пигмента при освещенности 5 кЛк значительно превышают значения аналогичных характеристик культуры при повышенной освещенности (табл. 2).

На основании экспериментальных данных была получена классическая зависимость содержания В-ФЭ от удельной облученности: концентрация пигмента гиперболически снижалась с ростом удельной освещенности клеток *P. purpureum* (рис. 5). При малых интенсивностях света содержания пигмента ( $\beta$ ) достигало максимального значения  $\beta_{\max}$ . С увеличением интенсивности света значения  $\beta$  снижались и в пределе достигали некоторого минимального значения  $\beta_{\min}$ . При удельной облученности около 10 Вт/(м<sup>2</sup> г) наблюдался “компенсационный пункт” фотосинтеза: дальнейшее снижение облученности приводило к “выцветанию” пигмента [29]. Отметим, что каж-

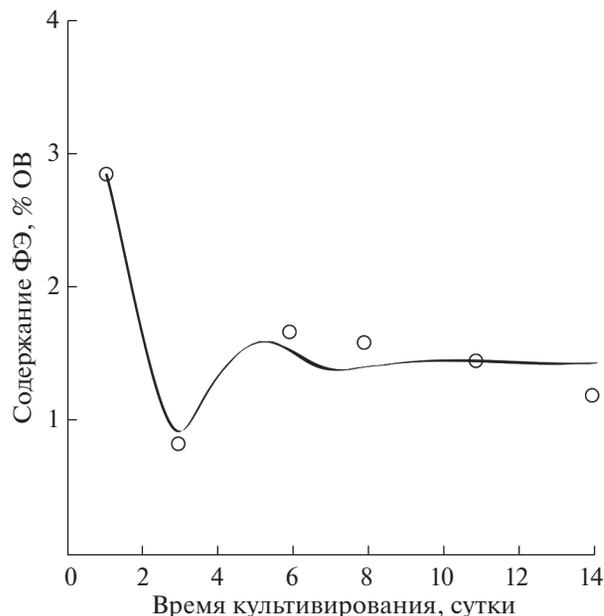


Рис. 4. Динамика содержания В-фикоэритрина в клетках *P. purpureum* при 15 кЛк. Аппроксимация экспериментальных данных уравнением (1).

дая точка такой кривой является квазистационарным состоянием, которое определяется уровнем внешней освещенности и плотности культуры. Однако это состояние достигается в течение некоторого времени, при этом динамика переходного процесса во времени носит сложный нелинейный характер согласно (1).

Ранее была предложена модель, которая позволяет прогнозировать содержание пигментов при культивировании микроводорослей с заданной внешней освещенностью [30]. В стационарном процессе (непрерывная культура) величина относительного содержания пигмента в биомассе водоросли определяется отношением установившихся концентраций пигмента и биомассы. Отношение содержания пигмента к максимально возможному (без процесса деструкции) определяется отношением концентраций пигментов: наблюдаемых и максимальных. Наблюдаемая концентрация определяется балансом синтезированных и разрушенных пигментов. Сведение математиче-

Таблица 2. Скорость синтеза В-ФЭ и его содержание в культуре *P. purpureum* при различной освещенности

Освещенность, кЛк	Скорость синтеза В-ФЭ, мг/(л сут)	Выход В-ФЭ за 6 сут, мг/л
5	10.3	74
10	1.4	20
15	0.4	12

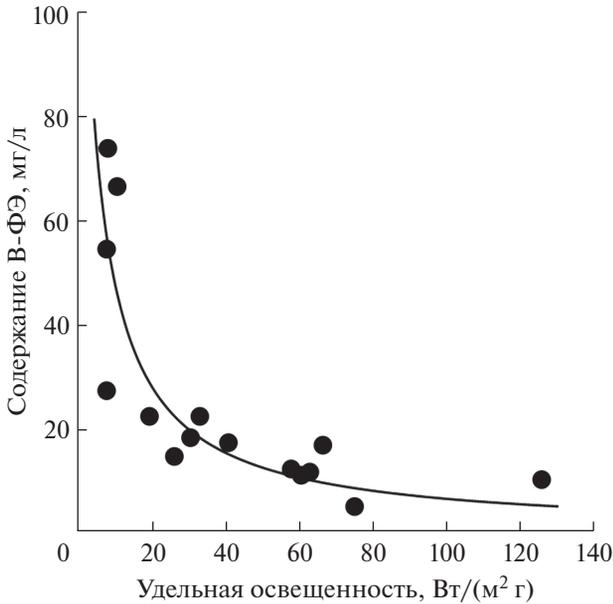


Рис. 5. Зависимость содержания В-фикоэритрина в культуре *P. purpureum* от удельной облученности. Аппроксимация экспериментальных данных уравнением (2).

ских форм записи происходящих процессов в единое целое приводит к следующей математической модели светозависимого содержания пигментов в клетках микроводорослей с учетом скорости роста:

$$\beta = \beta_{\max} \frac{\mu F_d}{\mu F_d + I_a}, \quad (2)$$

где  $\beta$  – относительное содержание пигмента в биомассе (%),  $\beta_{\max}$  – коэффициент, максимальное содержание пигмента в биомассе (%),  $\mu$  – удельная скорость роста/сут,  $F_d$  – коэффициент, деструктивная доза световой энергии для пигмента,  $I_a$  – интенсивность освещения ( $\text{Вт}/\text{м}^2$ ).

Среда обитания водорослей характеризуется неоднородностью и постоянно изменяющимися

световыми условиями. В результате адаптации к свету происходит структурно-функциональная перестройка фотосинтетического аппарата, направленная на более эффективное использование энергии светового потока. Концентрация пигментов в клетках является важнейшим показателем, который характеризует способность растительных клеток поглощать световую энергию. Модель (2) позволяет прогнозировать содержание В-ФЭ при различной освещенности и демонстрирует, что максимальное накопление пигментов будет в диапазоне освещенности 7–10  $\text{Вт}/(\text{м}^2 \text{ г})$ . Продуктивность культуры была также значительно выше при освещенности 10–20  $\text{Вт}/(\text{м}^2 \text{ г})$  (в среднем, в 3–5 раз), чем в вариантах с более высокой освещенностью. Таким образом, при низкой освещенности клеток микроводоросли *P. purpureum*, незначительно превышающей компенсационный пункт фотосинтеза, наблюдается как рост продуктивности культуры, так и рост содержания В-ФЭ, что предопределяет высокую продукцию пигментов культурой, а низкий уровень поверхностной освещенности является предпочтительным для выращивания *P. purpureum*.

Существенные различия по условиям освещенности клеток отражались не только на содержании ФБП в культуре *P. purpureum*, но и на их соотношениях. При этом значения соотношений В-ФЭ/Р-ФЦ и ВВ-ФЭ/АФЦ при 5 кЛк были значительно выше (в среднем, в 2–3 раза) на всем протяжении эксперимента, по сравнению с вариантами с более высоким уровнем освещенности, что свидетельствует о более высокой доле В-ФЭ при низкой освещенности (рис. 6).

Следует отметить, что изменение содержания ФБП *P. purpureum* происходило неравномерно. Значения соотношения В-ФЭ/Р-ФЦ на протяжении эксперимента снижались для вариантов эксперимента 10 и 15 кЛк, причем максимальное снижение (на 60%) и минимальные значения данного соотношения (2.5) зарегистрированы для освещенности 15 кЛк (рис. 6а). Соотношение В-ФЭ/АФЦ

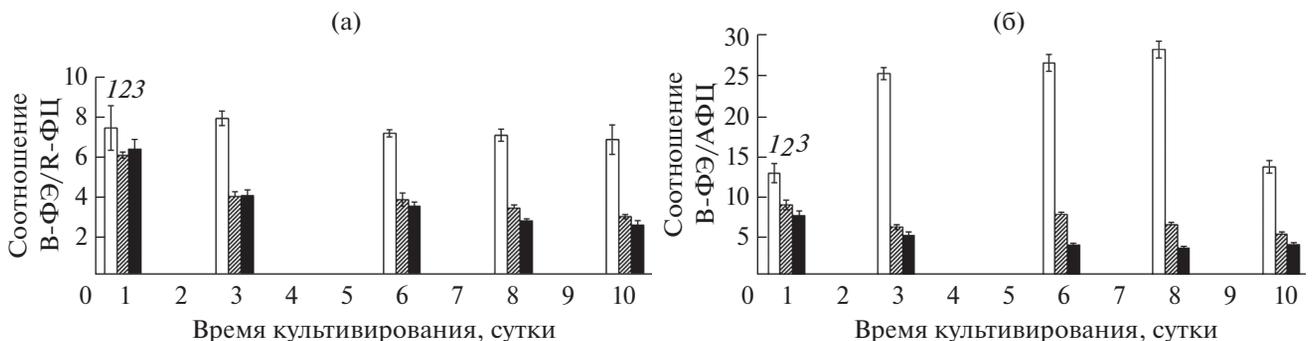


Рис. 6. Соотношение В-ФЭ/Р-ФЦ (а) и В-ФЭ/АФЦ (б) в культуре *P. purpureum* при различной освещенности. (1) 5 кЛк; (2) 10 кЛк; (3) 15 кЛк.

для вариантов эксперимента 10 и 15 кЛк также имело тенденцию к снижению на протяжении всего периода культивирования, причем минимальное значение (3.5) также зарегистрировано для варианта с максимальной освещенностью (рис. 6б). При освещенности 5 кЛк соотношение В-ФЭ/ R-ФЦ оставалось достаточно стабильным на протяжении всего эксперимента, несмотря на значительные изменения содержания В-ФЭ как в культуре, так и в клетках *P. purpureum*, что свидетельствует об отсутствии выраженного влияния световых условий на соотношение этих пигментов. В целом, культура *P. purpureum* при низкой освещенности (5 кЛк) характеризовалась значительно более высокой долей В-ФЭ по отношению к R-ФЦ и АФЦ по сравнению с другими вариантами эксперимента, что соответствует современным представлениям о влиянии освещенности на количественные соотношения ФБП. Повышенная освещенность в эксперименте вызвала уменьшение значений соотношений В-ФЭ/R-ФЦ и В-ФЭ/АФЦ в культуре *P. purpureum* до крайне низких значений (рис. 6). Уменьшение значения соотношения В-ФЭ/АФЦ для варианта с освещенностью 5 кЛк отмечено после 8-х суток эксперимента, что совпадало с переходом культуры на стационарную фазу роста и вероятным истощением элементов минерального питания в среде. Уменьшение индекса В-ФЭ/АФЦ в 2–4 раза, наблюдаемое при развитии азотного дефицита у *P. purpureum* (рис. 6б, 5 кЛк), свидетельствует о преимущественной деградаци В-ФЭ по сравнению с АФЦ, находящимся в сердцевине антенных структур, что согласуется с литературными данными о большей лабильности фикоэритрина как светособирающего пигмента [16, 18].

Ранее было показано, что продуктивность *P. purpureum* по биомассе может достигать 0.5 г/(л сут), а по В-ФЭ – 30–50 мг/(л сут) [7, 18, 27]. Следует отметить, что продуктивность *P. purpureum* в проведенном эксперименте при 5 кЛк достигала 0.4 г/(л сут) и получена при освещенности в 4 раза ниже, чем в указанном выше опыте [18], а также без дополнительного введения CO<sub>2</sub> в газоздушную смесь. Полученные результаты демонстрируют возможность значительно уменьшить затраты на энергетическую составляющую при выращивании *P. purpureum* с сохранением высокой скорости роста культуры. Успешное решение задачи повышения скорости синтеза В-ФЭ позволит повысить рентабельность выращивания *P. purpureum* как источника этого ценного природного пигмента.

В заключении, следует отметить, что проведенный молекулярно-генетический анализ подтвердил таксономическую принадлежность штамма IBSS-70 к *P. purpureum*. Определены продукционные характеристики накопительной культуры *P. purpureum* в диапазоне поверхностной освещенности 5–15 кЛк. Прирост плотности культуры

микроводоросли, соответствующий расчетной концентрации азота в питательной среде, получен только для варианта эксперимента с освещенностью 5 кЛк. Самое высокое содержание В-ФЭ как в клетках, так и в культуре *P. purpureum* (5.5% сухого вещества и 74 мг/л) также наблюдалось при минимальной освещенности (5 кЛк). Определён характер изменения содержания В-ФЭ в культуре *P. purpureum* в зависимости от удельной освещенности клеток микроводоросли: максимальное содержание пигмента наблюдалось при освещенности порядка 10 Вт/(м<sup>2</sup> г). Предложена модель, позволяющая прогнозировать содержание В-ФЭ при различной освещенности. Показано, что световой параметр культивирования оказывал значительное влияние на скорость роста микроводоросли *P. purpureum*, скорость синтеза и выход В-ФЭ: более низкий уровень поверхностной освещенности являлся предпочтительным для выращивания *P. purpureum*. Предложенный подход позволяет получать 0.4 г/(л сут) биомассы *P. purpureum*, содержащей значительные количества В-ФЭ. Таким образом, в условиях эксперимента важнейшим фактором, определяющим продукционные характеристики культуры *P. purpureum*, являлся световой, что нужно учитывать при его культивировании.

Работа выполнена в рамках темы Госзадания Федерального исследовательского центра “Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского Российской академии наук” № АААА-А18-118021350003-6, а также при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 18-74-00095).

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Borowitzka M.A. Microalgae as source of pharmaceutical and other biologically active compounds // J. Appl. Phycol. 1995. V. 7. P. 3. <https://doi.org/10.1007/BF00003544>
2. Razaghi A., Godhe A., Albers E. Effects of nitrogen on growth and carbohydrate formation in *Porphyridium cruentum* // Cent. Eur. J. Biol. 2014. V. 9. P. 156. <https://doi.org/10.2478/s11535-013-0248-z>
3. Manirafasha E., Ndikubwimana T., Zeng X., Lu Y., Jinget K. Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent // Biochem. Eng. J. 2016. V. 109. P. 282. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.025>
4. Цоглин Л.Н., Пронина Н.А. Биотехнология микроводорослей. М.: Научный мир, 2013. 184 с.
5. Asgharpour M., Rodgers B., Hestekin J.A. Eicosapentaenoic acid from *Porphyridium cruentum*: increasing growth and productivity of microalgae for pharmaceu-

- tical products // *Energies*. 2015. V. 8. P. 10487. <https://doi.org/10.3390/en80910487>
6. Fuentes-Grunewald C., Bayliss C., Zanain M., Pooley C., Scolamacchia M., Silkina A. Evaluation of batch and semi-continuous culture of *Porphyridium purpureum* in a photobioreactor in high latitudes using Fourier Transform Infrared spectroscopy for monitoring biomass composition and metabolites production // *Bioresour. Technol.* 2015. V. 189. P. 357. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.042>
  7. Fabregas J., Garcia D., Morales E., Dominguez A., Otero A. Renewal rate of semicontinuous cultures of the microalga *Porphyridium cruentum* modifies phycoerythrin, exopolysaccharide and fatty acid productivity // *J. Ferment. Bioeng.* 1998. V. 86. P. 477. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(98\)80155-4](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(98)80155-4)
  8. Kathiresan S., Sarada R., Bhattacharya S., Ravishankar A. Culture media optimization for growth and phycoerythrin production from *Porphyridium purpureum* // *Biotechnol. Bioeng.* 2006. V. 96. P. 456. <https://doi.org/10.1002/bit.21138>
  9. Sosa-Hernández J.E., Rodas-Zuluaga L.I., Castillo-Zacarias C., Rostro-Alanis M., Cruz R.; Carrillo-Nieves D., Salinas-Salazar C., Grunewald C.F., Llewellyn C.A., Olguin E.J., Lovitt R.W., Iqbal H.M.N., Parra-Saldívar R. Light intensity and nitrogen concentration impact on the biomass and phycoerythrin production by *Porphyridium purpureum* // *Mar. Drugs*. 2019. V. 17. P. 460. <https://doi.org/10.3390/md17080460>
  10. Унитис В.В., Пакалне Д.С., Шульце И.Ф. Оптимизация минерального питания красной морской водоросли *Porphyridium cruentum* // *Известия АН Латвийской ССР*. 1989. Т. 505. С. 95.
  11. Судьїна О.Г., Шнюкова Э.І., Мушак П.О., Лось С.І., Фомішина Р.М., Тупік Н.Д., Лозова Г.І., Золотарьова О. К. Біохімія червоних водоростей. Київ: Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, 2007. 320 с.
  12. Velea S., Ilie L., Filipescu L. Optimization of *Porphyridium purpureum* culture growth using two variables experimental design: light and sodium bicarbonate // *Sci. Bull. – Univ. “Politeh.” Bucharest, Ser. B*. 2011. V. 73. P. 81.
  13. Тренкеншу Р.П. Влияние света на рост микроводорослей в непрерывной культуре невысокой плотности // *Вопросы современной альгологии*. 2019. № 1 (19). С. 1. [https://doi.org/10.33624/2311-0147-2019-1\(19\)-1-7](https://doi.org/10.33624/2311-0147-2019-1(19)-1-7)
  14. Jahn W., Steinbiss J., Zetsche K. Light intensity adaptation of the phycobiliprotein content of the red alga *Porphyridium* // *Planta*. 1984. V. 16. P. 536. <https://doi.org/10.1007/BF00407086>
  15. Стадничук И.Н. Фикобилипротеины. Биологическая химия. М.: Мир, 1990. 196 с.
  16. Algarra P., Ruediger W. Acclimation processes in the light harvesting complex of the red alga *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross, according to irradiance and nutrient availability // *Plant Cell Environ.* 1993. V. 16. P. 149. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1993.tb00856.x>
  17. Sánchez-Saavedra M. del P., Castro-Ochoa F.Y., Nava-Ruiz V.M., Ruiz-Güereca D.A., Villagómez-Aranda A.L., Siqueiros-Vargas F., Molina-Cárdenas C.A. Effects of nitrogen source and irradiance on *Porphyridium cruentum* // *J. Appl. Phycol.* 2018. V. 30. P. 783. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1284-2>
  18. Gudvilovich I.N., Borovkov A.B. Production characteristics of the microalga *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew Ross (Rhodophyta) in batch and quasi-continuous culture // *Int. J. Algae*. 2014. V. 16. P. 271. <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v16.i3.70>
  19. Zimmermann J., Jahn R., Gemeinholzer B. Barcoding diatoms: evaluation of the V4 subregion on the 18S rRNA gene, including new primers and protocols // *Org. Divers. Evol.* 2011. V. 11. P. 173.
  20. Drummond A.J., Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees // *BMC Evol. Biol.* 2007. V. 7. P. 214.
  21. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing // *Nat. Methods*. 2012. V. 9. P. 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
  22. Stamatakis A., Hoover P., Rougemont J. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web-servers // *Syst. Biol.* 2008. V. 75. P. 758. <https://doi.org/10.1080/10635150802429642>
  23. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. Киев: Наук. думка, 1975. 247 с.
  24. Hara Y., Yokoyama A., Kim J.H. Systematic relationship of unicellular red algae: from phenetics to the phylogeny // *Algae*. 2000. V. 15. P. 7.
  25. Yokoyama A., Scott J.L., Zuccarello G.C., Kajikawa M., Hara Y., West J.A. *Corynoplatis japonica* gen. et sp. nov. and Dixonellales ord. nov. (Rhodellophyceae, Rhodophyta) based on morphological and molecular evidence // *Phycol. Res.* 2009. V. 57. P. 278. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2009.00547>
  26. Тренкеншу Р.П., Терсков И.А., Сидько Ф.Я. Плотные культуры морских микроводорослей // *Известия СО АН СССР. Серия биологических наук*. 1981. Т. 1. С. 75.
  27. Li T., Xu J., Wu H., Jiang P., Chen Z., Xiang W. Growth and Biochemical Composition of *Porphyridium purpureum* SCS-02 under Different Nitrogen Concentrations // *Mar. Drugs*. 2019. V. 17. P. 124. <https://doi.org/10.3390/md17020124>
  28. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С. Моделирование роста микроводорослей в культуре. Севастополь: ООО “Константа”, 2017. 152 с.
  29. Falkowski P.G., Owens T.G. Light-shade adaptation. Two strategies in marine phytoplankton. // *Plant Phycol.* 1980. V. 66. P. 592. <https://doi.org/10.1104/pp.66.4.592>
  30. Тренкеншу Р.П., Боровков А.Б., Ширяев А.В. Математическая модель светозависимого содержания пигментов в клетках морских микроводорослей в хемостате // *Экология моря*. 2005. Т. 69. С. 58.