

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 68, номер 5, 2021

---

---

## ОБЗОРЫ

Транскрипционный фактор RIPENING INHIBITOR и его гомологи в регуляции созревания сочного плода различных видов растений

*М. А. Слугина*

451

Изменение протеома и липидома мембран растительной клетки в ходе развития

*М. Ф. Шишова, В. В. Емельянов*

469

---

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Особенности экспрессии гена *uidA* под управлением тканеспецифичных промоторов генов *AP3* и *RPT2a Arabidopsis thaliana* L. в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum* L.

*Ю. В. Сидорчук, Т. В. Маренкова, В. В. Кузнецов, И. М. Герасименко, Ю. В. Шелудько, Е. В. Дейнеко*

489

Корреляция содержания аскорбиновой кислоты и профиля экспрессии генов монодегидроаскорбатредуктаз (MDHARs) у лука-порея (*Allium porrum* L.)

*М. А. Филюшин, О. К. Анисимова, Е. З. Кочиева, А. В. Щенникова*

501

Тепловой стресс, агрегация хлорофилл-белковых комплексов и светозависимое восстановление активности ФС II проростков пшеницы

*М. С. Христин, Т. Н. Смолова, В. Д. Креславский*

509

Суперинокуляция *Nicotiana benthamiana* способствует развитию иммунитета к вирусу кустистой карликовости томатов

*А. Б. Дилдабек, З. Б. Стамгалиева, Б. Б. Ильясова, Ж. Б. Тлеукулова, А. А. Мадиров, С. М. Касенова, Р. Т. Омаров, С. К. Наекова, А. Ж. Акбасова*

516

Оценка глутатионового статуса в корнях трансгенных по генам *psl* и *rapA1* растений томата при действии *Rhizobium leguminosarum*

*З. Р. Вершинина, О. В. Чубукова, Д. Р. Масленникова*

524

Возрастная изменчивость чувствительности листьев томата (*Solanum lycopersicum* L.) к круглосуточному освещению

*Т. Г. Шибалева, А. В. Мамаев, Е. Г. Шерудило, Е. Н. Икконен, А. Ф. Титов*

533

Хромато-масс-спектрометрическая идентификация гликозидов фенилэтиламидов гидроксикоричных кислот в суспензионной культуре клеток *Mandragora turcomanica*

*Д. В. Кочкин, Б. А. Галишев, М. В. Титова, Е. В. Попова, А. М. Носов*

544

Оценка физиологического состояния микроводорослей с помощью цитометрических и флуоресцентных показателей

*Е. С. Соломонова, А. И. Акимов*

553

---

---



УДК 581.1.575.113.1

## ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР RIPENING INHIBITOR И ЕГО ГОМОЛОГИ В РЕГУЛЯЦИИ СОЗРЕВАНИЯ СОЧНОГО ПЛОДА РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ

© 2021 г. М. А. Слугина\*

<sup>a</sup>Институт биоинженерии Федерального исследовательского центра  
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: mashinmail@mail.ru

Поступила в редакцию 28.10.2020 г.

После доработки 13.01.2021 г.

Принята к публикации 15.01.2021 г.

MADS-доменный транскрипционный фактор RIPENING INHIBITOR (RIN) является глобальным регулятором процесса созревания плода томата *Solanum lycopersicum* L. RIN контролирует каскад реакций созревания сочного плода одновременно на нескольких уровнях: активируя экспрессию генов других регуляторных белков; активируя гены биосинтеза этилена (инициируя этилен-зависимый сигнальный путь); непосредственно запуская транскрипцию генов биосинтеза каротиноидов, ароматических соединений, генов метаболизма углеводов и модификации клеточной стенки (регулируя этилен-независимый путь); а также участвует в некоторых эпигенетических модификациях, сопровождающих процесс созревания сочного плода. Будучи открыты первоначально у томата, на сегодняшний день гомологи RIN описаны для многих культур с сочным плодом. В обзоре рассмотрены молекулярные особенности транскрипционного фактора RIN и его гомологов – MADS-факторов транскрипции различных видов растений, выполняющих схожую с RIN функцию контроля процессов созревания сочного плода и имеющих схожую эволюционную историю. Охарактеризованы структура, пространственно-временная экспрессия, гены-мишени данных регуляторов. На примере однодольных и двудольных растений, формирующих сочный плод, таких как томат, банан, перец, виноград, земляника показано, что MADS-белки подсемейства SEPALLATA играют центральную роль в чрезвычайно сложной транскрипционной регуляции каскада реакций созревания как климактерических, так и неклимактерических плодов.

**Ключевые слова:** сочный плод, созревание плода, репродуктивное развитие, MADS-доменные факторы транскрипции, RIN

DOI: 10.31857/S0015330321050183

### ВВЕДЕНИЕ

#### ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СОЗРЕВАНИЯ СОЧНОГО ПЛОДА

Плод – специализированный орган растений, необходимый для распространения семян. Исходя из морфологических и анатомических особенностей, существует множество признаков для классификации плодов. По наличию сочной мякоти плоды принято разделять на сухие и сочные. Сухие и сочные плоды образованы схожими тканями, однако различаются уровнем лигнификации, числом и размером клеток [1, 2].

В процессе эволюции сочный плод появился позднее, и его возникновение представляет эволюционное преимущество для растений, так как сочные плоды более привлекательны для живот-

ных, что позволяет растительному виду расширить ареал распространения семян [1, 2].

Развитие сочного плода включает несколько этапов: закладка, рост, созревание (maturation) и стадия биологической спелости (ripening). Созревание сочного плода – сложный процесс, сопровождающийся изменением физиологических и биохимических характеристик, включая содержание и состав фитогормонов, сахаров, пигментов, ароматических соединений, а также модификацию структуры клеточных стенок.

Исходя из физиологических особенностей, процесс созревания сочного плода может быть климактерическим и неклимактерическим [3, 4]. Климактерические плоды имеют характерный паттерн изменения интенсивности дыхания: у развивающегося плода дыхание сначала медленно снижается до нижней точки, известной как доклимактерический минимум (на данной стадии

плод остается неспелым). Затем интенсивность дыхания начинает динамично расти, достигая климактерического максимума. В этот момент у большинства растений (или несколькими часами или днями позже) плод достигает биологической спелости. После стадии климактерического максимума интенсивность дыхания снижается, что свидетельствует о начале стадии старения плода [3]. Росту интенсивности дыхания у климактерических плодов сопутствует резкий скачок синтеза этилена [5]. Примерами климактерических плодов служат плоды томата, банана, яблока, авокадо, груши [4]. У неклимактерических плодов процесс созревания не сопровождается усилением интенсивности дыхания, и концентрация этилена при этом остается на низком уровне [4, 5]. Неклимактерические плоды – у земляники, винограда, цитрусовых, ананаса и др. [4].

Наличие этилена необходимо для нормально-го протекания процесса созревания климактерических плодов, так как он служит регулятором транскрипции и трансляции многих генов созревания [5]. Подтверждением этому является замедление или отсутствие созревания у трансгенных растений с заблокированным биосинтезом этилена [5].

Долгое время считалось, что роль этилена в неклимактерических плодах крайне ограничена, но многие современные исследования свидетельствуют об обратном. Например, у плодов винограда (*Vitis vinifera* L.) показано наличие функционального сигнального пути этилена, запуск которого сопровождается ростом плода и синтезом антоцианов [6]. У ананаса (*Ananas comosus* L. Merr.) процесс созревания сопровождается активацией генов биосинтеза этилена [7]. Однако механизмы этилен-опосредованной регуляции созревания неклимактерических плодов изучены недостаточно [8], поэтому данной проблеме посвящено множество современных исследований.

Несмотря на то, что этилен считается главным триггером процесса созревания, кроме этилен-зависимых существуют также и этилен-независимые пути активации генов созревания [5]. Помимо этилена в регуляции созревания сочного плода могут принимать участие и другие фитогормоны, однако, в настоящий момент, такие данные неоднозначны. Ранее считалось, что ауксин оказывает существенное влияние на процессы роста и созревания плода земляники (*Fragaria × ananassa* Duch.), так как рост цветоложа зависит от поступления в него ауксина из семян (или орешков) [9]. В то же время анализ транскриптомов развивающегося плода земляники (многоорешка) выявил высокий уровень экспрессии генов биосинтеза и сигнального пути ауксина и в самом цветоложе в процессе созревания ложной ягоды [9]. Кроме того, в развитии плода земляники принимают участие

и другие фитогормоны: гиббереллины [10], абсцизовая кислота [11, 12], жасмоновая кислота [13] и брассиностероиды [14]. При этом этилен не играет определяющей роли в процессе созревания земляники [15], хотя оказывает важное влияние на инициацию некоторых отдельных аспектов [16], но не всего процесса созревания, как в случае климактерических плодов [9].

Как в случае этилен-зависимого, так и в случае этилен-независимого пути созревания пространственно-временную координацию работы комплексов генов созревания осуществляют транскрипционные факторы (ТФ), связываясь с их промоторами и контролируя уровень их транскрипции. Транскрипционные факторы могут контролировать экспрессию генов как индивидуально, так и в комплексе с другими ТФ и белками.

Среди всех ТФ, регулирующих созревание сочного плода, особенно важную роль играет семейство MADS-доманных белков [17]. Представители данного семейства обнаружены в геномах всех эукариот и характеризуются присутствием N-концевого высоко консервативного ДНК-связывающего домена MADS. Наиболее полно охарактеризованные MADS-ТФ растений принадлежат к типу II (MKS-тип) и играют важнейшую роль во всех процессах развития, контролируя не только идентичность цветковой меристемы и органов цветка, но и различные аспекты развития семяпочек и плодов [18, 19].

На сегодняшний день основным модельным растением с сочным плодом является томат обыкновенный (томат овощной; *Solanum lycopersicum* L.). Изучение спонтанных мутаций с ярким фенотипическим проявлением позволило выявить три регуляторных белка, без которых невозможно созревание сочного плода томата. К ним относятся MADS-ТФ RIPENING INHIBITOR (RIN, или SIMADS-RIN), NAC-ТФ NO-RIPENING (NOR), а также SPL-ТФ COLORLESS NON-RIPENING (CNR) [20–22]. Будучи открыты 20–50 лет назад, в настоящее время кодирующие их гены считаются ключевыми регуляторами созревания плода томата [23–25].

ТФ RIN запускает каскад реакций созревания, активируя экспрессию генов двух других регуляторов, NOR и CNR, тем самым контролируя наиболее ранние этапы созревания плода [23]. RIN также активирует гены биосинтеза этилена, иницируя этилен-зависимый сигнальный путь [4]. RIN может непосредственно запускать и транскрипцию генов биосинтеза каротиноидов и ароматических соединений, а также генов модификации клеточной стенки [26, 27], тем самым регулируя этилен-независимый путь созревания плода. Кроме того, RIN участвует в некоторых эпигенетических модификациях, например, метилировании ДНК [23], являясь, таким образом, глобальным

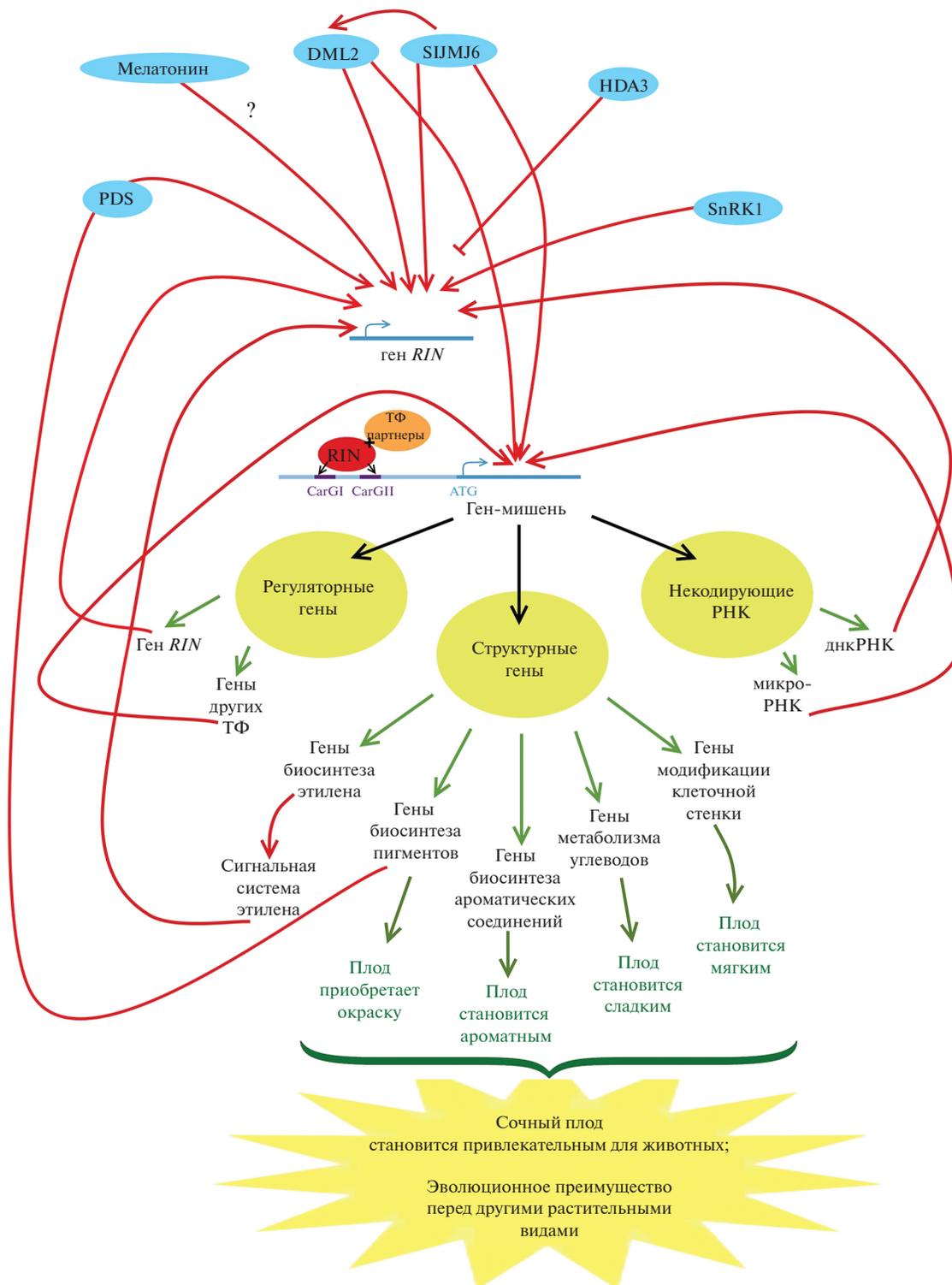


Рис. 1. Молекулярные механизмы созревания сочного плода, контролируемые транскрипционным фактором RIN.

регулятором процесса созревания плода томата (рис. 1) [28].

Исследования ТФ, определяющих сроки созревания сочных плодов, помимо теоретическо-

го, приобрели и большое практическое значение. Это подтверждается растущим количеством обзоров, посвященных контролю созревания сочного плода и участию в нем гена *RIN* [24, 29–31, 36]. Накопленные знания уже становятся предметом

для экспериментов в области биотехнологии растений с использованием современных методов редактирования генома. Плоды с дефицитом активности *RIN*, полученные с помощью CRISPR/Cas9, созревают одновременно с плодами дикого типа (WT), но в сравнении с WT, синтезируют лишь 10% каротиноидов и этилена, а также значительно пониженное количество летучих веществ [32–34]. Это подтверждает участие *RIN* в созревании сочного плода и свидетельствует о его неучастии в инициации созревания [33]. То, что плоды растений с CRISPR/Cas9-нокаутом *RIN* демонстрируют избыточное смягчение и ускоренную деградацию клеточной стенки по сравнению с диким типом, позволило предположить, что *RIN* подавляет перезревание плода [35]. Кроме того, было показано, что усеченный ТФ *RIN*, лишенный С-концевого домена, кодируемый другим аллелем локуса *RIN* (*rinG2*), не активирует транскрипцию, но, подобно *RIN* дикого типа, образует комплексы ТФ, которые связываются с целевыми областями генома. Плоды, экспрессирующие *RING2*, имеют увеличенный срок хранения, но в отличие от плодов *rin*, накапливают ликопин и выглядят оранжевыми [35].

Большинство таких исследований и обзоров сосредоточено на модельном объекте – томате обыкновенном, однако эти данные не всегда возможно экстраполировать на другие культуры. С другой стороны, в последние годы накапливается все больше несистематизированных данных о гомологах ТФ *RIN* у видов растений как с климактерическим, так и с неклимактерическим типом созревания плода. Поэтому в данном обзоре особое внимание уделено сравнительной характеристике гомологов ТФ *RIN*, включая их роль в регуляции созревания сочного плода различных видов растений.

Гомологи MADS-ТФ *RIN* описаны для многих культур с сочным плодом. При этом у некоторых культур найдены полные функциональные гомологи *RIN*, а у других выявлено несколько функционально избыточных белков, сходных с *RIN* по структуре и/или функции. Объединяющим признаком является общее эволюционное происхождение данных белков, входящих в MADS-подсемейство SEPALLATA (SEP), но представляющих различные клады. Так, гены томата *RIN* и перца *CaMADS-RIN* гомологичны гену *SEP4 Arabidopsis thaliana* L. и относятся к кладе SEP4 [37]. Гены винограда, кодирующие функциональные гомологи *RIN*, относятся сразу к двум различным кладам: SEP3 (*VviSEP3*) и SEP4 (*VviSEP4*) [38]. Наиболее близкий по структуре гену *RIN*, ген земляники *FaSEP4* в плодах экспрессируется крайне низко, в отличие от гена *FaMADS9* (клада SEP1/2), гомология которого с *RIN* ниже, но который при этом высоко транскрибируется в плоде [4]. Подобные различия предполагают, что дупликация и дивер-

сификация *SEP*-генов может лежать в основе современного многообразия форм и качеств климактерических и неклимактерических сочных плодов [37].

### СТРУКТУРА ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА *RIN* И ЕГО ГОМОЛОГОВ

*RIN* и его гомологи у других видов растений относятся к МІКС-типу MADS-ТФ и имеют схожую структуру: последовательно расположенные высоко консервативный N-концевой MADS-домен, междоменная I-область, средне консервативный кератин-подобный домен K и высоко варибельная С-концевая область (рис. 2).

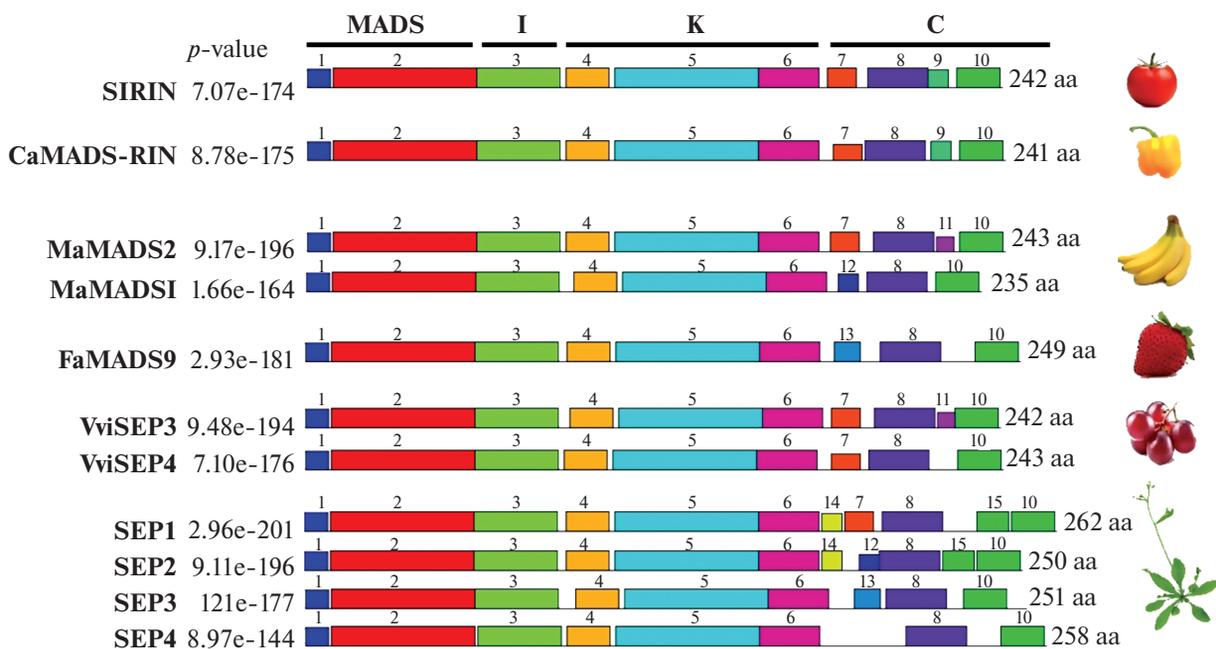
Домен MADS у МІКС-ТФ, в том числе у представителей клады SEP, относится к доменам типа MEF2-like (IPR033896; myocyte enhancer factor 2-like) [39]. Одной из функций данного домена является связывание с ДНК, а также участие в гомо- и гетеродимеризации [39, 40]. Функция K-домена заключается в образовании межбелковых связей [18]. С-область белка предположительно участвует в активации транскрипции и в образовании комплексов высокого порядка [18, 41, 42].

Белки ТФ, гомологичных *RIN*, определяющих процесс созревания сочного плода, а также родственные белки клады SEP *A. thaliana* имеют сходные размеры (235–251 а.о.), молекулярную массу (от 26.9 до 29.5 кДа) и протяженность доменов и междоменных областей (рис. 2). Структура данных белков консервативна у различных видов однодольных и двудольных растений, независимо от типа формируемого плода.

### ПРОСТРАНСТВЕННО-ВРЕМЕННАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *RIN* И ЕГО ГОМОЛОГОВ

В геноме *A. thaliana* имеется четыре *SEP*-гена, которые представляют отдельные клады SEP1, SEP2, SEP3 и SEP4, различающиеся, в первую очередь, паттернами экспрессии [43, 44]. Согласно общепринятой генетической модели развития цветка ABCDE, гены *SEP1* (*AGL2*), *SEP2* (*AGL4*) и *SEP3* (*AGL9*) транскрибируются в области закладки цветковых органов трех внутренних мутовок и, далее, в развивающихся лепестках, тычинках и плодолостиках до стадии терминации цветка [4, 37]. Профили экспрессии генов-гомологов *SEP4* (*AGL3*), в том числе *RIN*, гораздо более разнообразны. Так, ген *SEP4* (*A. thaliana*) транскрибируется во всех кругах цветка и других надземных органах растения, ген петунии *PhFBP4* – в чашелистиках, лепестках, пестике и плоде, а ген яблони *MdMADS4* – во всех четырех кругах цветка и плодах [37].

Среди растений с сочным плодом экспрессия *SEP4*-подобного гена *RIN* впервые была описана



**Рис. 2.** Основные домены и консервативные мотивы белков транскрипционных факторов подсемейства SEP, определяющих созревание сочного плода у различных видов растений. RIN (SIRIN; GenBank: AAM15775.1) – *S. lycopersicum*; CaMADS-RIN (CaRIN; GenBank: ABJ98752.1) – *C. annuum*, MaMADS2 (GenBank: ACJ64678.1) и MaMADS1 (GenBank: ACJ64679.1) – *M. acuminata*; FaMADS9 (GenBank: AAO49380.1) – *F. ananassa*; VviSEP3 (GenBank: AAM21344.1) и VviSEP4 (GenBank: XP\_002263410.2) – *V. vinifera*; SEP1 (GenBank: NP\_001119230.1), SEP2 (GenBank: NP\_186880.1), SEP3 (GenBank: AAB67832.1) и SEP4 (GenBank: AAB38975.1) – *A. thaliana*. Консенсусные последовательности консервативных мотивов, выявленные с помощью программы MEME Suite 5.1.1 (<http://meme-suite.org/index.html>): 1 – MGR-GRVEL, 2 – RIENKINRQVTFAKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIIFSNRGKLYEFCS, 3 – SSSMLKTLEREQKCSY-GALEVNPQAKEEQ, 4 – YQEYLKLLKARVEALQ, 5 – QRNLLGEDLGPLNTKELEQLERQLDSSLKQIRSTKTQYMLD-QLSDLQRKE, 6 – QMLLEANKALRRKLEESSQAN, 7 – WEPGEQNVQY, 8 – QPQSEGFQPLECNPTLQIGY, 9 – GYDNPVP, 10 – AASQSVNGYIPGWM, 11 – PDPIAI, 12 – WENYGHP, 13 – WEHGGDHQH, 14 – NHIGGGW, 15 – NPVCSEQIAVT.

у томата обыкновенного [4]. *RIN* экспрессируется, главным образом, в плодах, достигая максимума во время инициации созревания (стадия Breaker) и полного покраснения плода (стадия Red Ripe) [45]. В отличие от многих других генов созревания плода томата, экспрессия *RIN* практически не зависит от воздействия этилена [4].

Интересно, что структурный гомолог гена *RIN*, ген *CaMADS-RIN* перца *Capsicum annuum* L. экспрессируется не только в плодах, но и в корнях, стеблях, листьях и цветках, но на низком уровне. Тем не менее, на конечных стадиях созревания плода транскрипция гена резко увеличивается, достигая максимума [8].

Два структурных гомолога *RIN*, гены *MaMADS1* и *MaMADS2* банана *Musa acuminata* L. по-разному экспрессируются в мякоти и кожуре плода, что предполагает наличие независимых механизмов созревания для различных частей плода. Так же, как и *RIN*, ген *MaMADS2* транскрибируется независимо от воздействия этилена [44, 46].

У земляники *F. × ananassa* Duch. ген-гомолог *RIN*, *FaMADS9*, слабо экспрессируется в цветоложе и высоко в орешках, имея два пика резкого ро-

ста экспрессии – на стадиях зеленого и красного плода [47].

Структурные гомологи *RIN* винограда *V. vinifera* L., гены *VviSEP4* и *VviSEP3*, транскрибируются в период созревания плодов [38, 48–51]. Но, в отличие от *RIN*, их экспрессионный профиль не имеет такой же четкой взаимосвязи с началом периода смены окраски (стадия *Véraison*) [52].

В мезокарпе плодов масличной пальмы (*Elaeis guineensis* Jacq.) экспрессируется пять *SEP*-генов, два из которых (CL1Contig8010, CL1Contig3848) активируются в период всплеска синтеза этилена, но являются структурными гомологами *SEP3*, а не *RIN* [53].

Структурный гомолог *RIN* идентифицирован и у ананаса *A. comosus* – *AcMADS1*; подобно *RIN*, данный ген экспрессируется в период созревания плода [54].

Таким образом, несмотря на существенные различия в морфологии и физиологии плодов, как климактерических, так и неклимактерических, как однодольных, так и двудольных, как настоящих, так и ложных (земляника, ананас), у всех описанных видов растений процесс созрева-

ния сочного плода сопровождается экспрессией одного или нескольких MADS-генов подсемейства *SEP*.

### ГЕНЫ-МИШЕНИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА RIN И ЕГО ГОМОЛОГОВ

MADS-белки регулируют экспрессию, связываясь со специфичным CArG-box-мотивом в промоторе гена-мишени. Данный мотив имеет каноническую последовательность  $CC(A/T)_6GG$ . Последовательность CArG-box, предпочтительно узнаваемая ТФ RIN (консенсус  $CCA(A/T)(A/t)(A/T)ATAG$ ), имеет высокую степень сходства с таковыми у ТФ SEP4 и SEP1 *A. thaliana* и содержит 'CCA' в начале и 'TAG' в конце мотива, а в центре исключительно А или Т [55]. Многие гены, экспрессия которых регулируется ТФ RIN, содержат в составе промотора данный консенсус. Однако в промоторах некоторых генов-мишеней найдены нетипичные CArG-box-мотивы. К примеру, промотор гена экспансина томата *LeEXP1* содержит неканонический CArG-box (CAATTTAAAG), а в промоторе гена 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатсинтазы *LeACS4* найдено три неканонических мотива (CAAATATAAG, CAATTTAAAG и STAGTTAAAG). Методом ChIP-seq (метод анализа ДНК-белковых взаимодействий, основанный на иммунопреципитации хроматина (ChIP) и высокоэффективном секвенировании ДНК) показано, что сила связывания RIN с данными неканоническими мотивами больше, чем в случае CArG-box-консенсуса, что предполагает наличие более широкого спектра CArG-box мотивов, с которыми может связываться ТФ RIN *in vivo* [56]. Кроме того, связывание RIN исключительно с промоторами генов созревания может регулироваться составом белковых комплексов, в которые входит ТФ RIN [56]. Также селективность связывания может зависеть от структуры хроматина в промоторе целевого гена (например, от модификации гистонов, или степени метилирования) [56].

Согласно модели "квартет" (quartet model), ТФ RIN формирует тетрамерные комплексы с другими MADS-белками [57]. В частности, RIN предположительно способствует сборке мультимерных комплексов, как это показано для SEP-белков *A. thaliana* [56], и образует гомо- и гетеродимеры с MADS-белками подсемейств APETALA1 (AP1)/FRUITFULL (FUL) (TM4 = TDR4 = FUL1 и SLMBP7 = FUL2), SEP (*LeMADS1* = ENHANCER-OF-JOINTLESS-2) и AGAMOUS (TAGL1 и TAG1) [55, 58]. С учетом известных взаимодействий RIN, предполагается сборка комплексов RIN-FUL1-FUL2-TAGL1, RIN-FUL1-FUL2-TAG1 и других, каждый из которых специфичен к своему набору генов-мишеней и, таким образом, позволяет ТФ RIN контролировать определенный пул генов в зависимости от регулируемого про-

цесса [55, 59]. Связывание комплекса, включающего ТФ RIN, с промоторами некоторых генов-мишеней в таком случае задействует сразу два CArG-box мотива [56] (рис. 1). ТФ RIN, в отличие от MADS-ТФ других подсемейств, имеет активаторный домен, что может использоваться тетрамерным комплексом для активации транскрипции генов-мишеней [56].

Для выявления генов-мишеней ТФ RIN применялись различные подходы: биоинформатический поиск CArG-box сайтов в промоторах потенциальных мишеней; ChIP-seq; сравнение транскриптомов томата дикого типа и с *rin*-мутацией. Результатом множества исследований стало достаточно подробное описание генов-мишеней RIN у томата обыкновенного [23, 55, 56, 60, 61]. Сравнение транскриптомов томата дикого типа и *rin*-мутанта обнаружило 342 гена созревания, экспрессия которых активируется ТФ RIN, и 473 гена, на экспрессию которых RIN оказывает негативное влияние [60]. Методом ChIP-seq было выявлено 292 гена, которые могут являться мишенями RIN [23]. Более того, с помощью RNA-seq показано, что RIN является именно активатором для своих генов-мишеней, а негативное воздействие на транскрипцию может объясняться метилированием сайтов связывания с RIN. В процессе созревания плода данные сайты деметилируются, в результате чего RIN может с ними связаться, что приводит к созреванию плода [23].

Ранее фенотипические проявления мутации *rin* объясняли отсутствием в клетке функционального белка RIN и, как следствие, нарушением профиля экспрессии контролируемых им генов. Однако детальный анализ показал, что у *rin*-растений вместо ТФ RIN образуется химерный ТФ RIN-MACROCALYX (MC, подробнее см. ниже), который связывается со своими специфическими мишенями [61]. Таким образом, на сегодня можно выделить три группы генов-мишеней, регулируемых белком RIN (1), совместно RIN и химерным ТФ (2) или только химерным белком (3). Так как настоящий обзор посвящен именно ТФ RIN, далее будут рассмотрены именно его гены-мишени.

Предполагается, что ТФ RIN может регулировать созревание за счет: (1) непосредственного связывания с промоторами генов созревания, что приводит к активации их экспрессии; (2) активации генов биосинтеза этилена, который в свою очередь запускает этилен-зависимые реакции созревания; (3) активации генов других ТФ, продукты которых, в свою очередь, запускают новые каскады реакций созревания.

Предположительно три описанных каскада реакций работают в клетке параллельно друг другу [56, 60] (рис. 1). Функционально гены-мишени RIN можно разделить на несколько групп (рис. 1, табл. 1) [23, 56, 61].

**Таблица 1.** Мишени ТФ RIN.

Функциональная группа	Гены-мишени ТФ RIN
Гены транскрипционных факторов	AP2-EREBP ( <i>Solyc03g044300</i> , <i>ERF2</i> ); GRAS ( <i>GRAS1</i> , <i>GRAS9</i> , <i>Solyc02g085600</i> , <i>Solyc01g008910</i> ); MYB ( <i>Solyc06g076770</i> ), MADS ( <i>TDR4</i> ); C2H2 ( <i>Solyc04g077980</i> ); bZIP ( <i>abz1</i> , <i>Opaque 2</i> ); HSF ( <i>Solyc12g007070</i> ); NAC ( <i>NAC-NOR</i> ); auxin-responsive protein ( <i>Solyc06g053840</i> ); Histone-Lys N-methyltransferase NSD3 ( <i>Solyc01g103250</i> ); C2C2-CO-like ( <i>Solyc12g096500</i> ); SBP ( <i>LeSPL-CNR</i> ); ULT ( <i>Solyc07g054450</i> ); WRKY ( <i>Solyc02g021680</i> )
Гены транскрипционных регуляторов	auxin-responsive protein ( <i>Solyc03g120390</i> ), transcription elongation factor A protein2 ( <i>Solyc10g080930</i> ), DNA-repair protein ( <i>Solyc06g050510</i> ).
Гены биосинтеза и сигнального пути этилена	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthases ( <i>ACS2</i> , <i>ACS4</i> ), 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidases ( <i>ACO1</i> , <i>ACO3</i> , <i>ACO5</i> ), ethylene receptors ( <i>ETR3/NR</i> , <i>ETR4</i> , <i>ETR6</i> , <i>EIN3</i> , <i>EBF1</i> , <i>EBF2</i> , <i>EIL4</i> , <i>E4</i> )
Гены метаболизма каротиноидов	phytoene synthase ( <i>PSY1</i> ), 15-cis-zeta-carotene-isomerase ( <i>ZISO</i> ), $\beta$ -carotene hydroxylase ( <i>CHY</i> ), geranyl diphosphate synthase ( <i>GPPS2</i> ), lycopene beta-cyclase ( <i>LCY-b</i> ), isopentenyl-diphosphate delta-isomerase ( <i>IPP2</i> ), zeta-carotene desaturase ( <i>ZDS</i> ), carotenoid isomerase ( <i>CrtISO</i> ), plastid terminal oxidase ( <i>PTOX</i> ), protein LUTEIN DEFICIENT ( <i>CYP97A3</i> )
Гены метаболизма флавоноидов и антоцианов	4-coumarate: CoA ligase ( <i>4CL</i> ), phenylalanine ammonia-lyase ( <i>PAL</i> )
Гены модификации клеточной стенки и гены метаболизма сахаров	endo-1,4- $\beta$ -glucanases ( <i>Cel2</i> , <i>Cel3</i> , <i>Cel6</i> ), expansin-like protein ( <i>EXLAI</i> ), LeXYL1, xyloglucan endotransglucosylase hydrolase ( <i>XTH3</i> ), extensin ( <i>tegII</i> ), L-arabinokinase ( <i>ARA-1</i> ), expansins ( <i>EXP</i> , <i>EXPA5</i> , <i>EXPA6</i> ), beta-fructofuranosidases ( <i>TAI</i> , <i>LIN</i> ), polygalacturonases ( <i>PS-2</i> , <i>PGcat</i> ), arabinogalactan protein ( <i>AGP-1c</i> ), pectinesterase ( <i>PME2.1</i> ), xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase protein 8 ( <i>XTH8</i> ), beta-galactosidases ( <i>TBG1</i> , <i>TBG4</i> , <i>TBG7</i> ), mannan endo-1,4-beta-mannosidase 4 ( <i>LeMAN4</i> )
Другие группы генов	<i>SGN-U571769</i>
Самоактивация	<i>RIN</i>
МикроРНК	<i>MIR172a</i>
Длинные некодирующие РНК	<i>lncRNA2155</i> , <i>lncRNA1780</i> , <i>lncRNA3197</i> , <i>lncRNA2250</i> , <i>lncRNA609</i> , <i>lncRNA443</i> .

**Регуляторные гены** (гены транскрипционных факторов и транскрипционных регуляторов). Одним из подтверждений ключевой роли ТФ RIN в созревании сочного плода является тот факт, что он способен регулировать не только гены ферментов созревания, но и гены других ТФ, которые в свою очередь запускают подчиненные им каскады реакций. Белок RIN регулирует экспрессию генов ТФ различных семейств: AP2-EREBP, GRAS, MYB, MADS, C2H2, bZIP, HSF, NAC, WRKY и др. (рис. 1, табл. 1).

**Структурные гены.** Среди них можно выделить гены биосинтеза этилена, его рецепторов и гены ответа на воздействие этилена; гены метаболизма сахаров, каротиноидов, флавоноидов и антоцианов; гены модификации клеточной стенки (рис. 1, табл. 1).

Отдельно стоит отметить возможность **самоактивации**. Достоверно показано, что белок RIN *in vivo* способен активировать транскрипцию собственного гена, связываясь с CArG-box сайтами в

собственном промоторе, что указывает на наличие механизма авторегуляции и объясняет резкое возрастание экспрессии гена RIN при созревании (рис. 1, табл. 1) [56].

**МикроРНК.** При изучении профилей экспрессии микроРНК у томата дикого типа и у *rin*-мутанта была показана дифференциальная экспрессия микроРНК 14 семейств; в промоторах генов многих из этих микроРНК найдены CArG-box мотивы. Достоверно показано, что ТФ RIN связывается с промотором гена микроРНК MIR172a (рис. 1, табл. 1) [63].

**Длинные некодирующие РНК.** Большинство исследований, посвященных поиску мишеней ТФ RIN, сконцентрировано на функциональных генах, однако помимо кодирующих последовательностей, показано, что RIN способен связываться и с длинными некодирующими РНК (днкРНК; long non-coding RNAs, lncRNAs) [64]. днкРНК представляют собой последовательности длиной более 200 п.н. [65], которые не кодируют белок, однако,

играют важную роль в транскрипционной и пост-транскрипционной регуляции генов, эпигенетических модификациях в процессах дифференциации и развития клеток [64].

С целью поиска днкРНК-мишеней RIN было проведено широкоформатное исследование генома томата с помощью ChIP-seq в сочетании с транскриптомным анализом [64]. В результате найдено 627 днкРНК, содержащих в промоторах один или несколько сайтов связывания с RIN. 187 из них дифференциально экспрессировались в растениях томата с мутацией *rin* в сравнении с диким типом. Дальнейший *in vivo* и *in vitro* анализ подтвердил непосредственное связывание (разной силы) RIN с промоторами шести найденных генов днкРНК (lncRNA2155, lncRNA1780, lncRNA3197, lncRNA2250, lncRNA609 и lncRNA443) [64]. Более того, CRISPR/Cas9-нокаут генов данных шести днкРНК показал изменение фенотипа плода (задержка стадий покраснения (pink stage) и созревания) при замалчивании lncRNA2155 [64]. Это коррелировало с паттерном экспрессии lncRNA2155, чей экспрессионный максимум приходится на стадию покраснения плода. При этом снижался уровень экспрессии генов метаболизма этилена (*ACS2* и *ACS4*) и биосинтеза каротиноидов (*PSY1* и *ZDS*), а также генов ключевых ТФ созревания (*NOR*, *CNR*) и, что интересно, самого гена *RIN*, что, среди прочего, может указывать на наличие обратной регуляторной петли lncRNA2155-RIN (рис. 1) [64].

Таким образом, мишенями ТФ RIN могут быть как регуляторные и структурные гены, так и некодирующие регуляторные РНК (микроРНК, днкРНК), и, в совокупности, все они образуют сложную регуляторную сеть, обеспечивающую созревание сочного плода (рис. 1).

### РОЛЬ ТФ RIN И ЕГО ГОМОЛОГОВ В КОНТРОЛЕ СОЗРЕВАНИЯ СОЧНОГО ПЛОДА РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ

*Растения, формирующие климактерические плоды*

**Томат.** Плоды томата обыкновенного (*S. lycopersicum* L.) являются примером наиболее изученных климактерических плодов [30, 66]. Полногеномная последовательность томата известна и достаточно хорошо охарактеризована [67], для томата получено множество рекомбинантных линий, и он относительно легко поддается трансформации (что важно при изучении функций генов).

На сегодняшний день для томата обыкновенного доступна самая полная информация о структуре, регуляции и партнерах RIN, а также о каскаде запускаемых им реакций [31]. Впервые существование данного гена было предположено именно у томата в 1968 году при анализе растений с *rin*-мутацией, характеризующихся отсутствием созре-

вания плода [20]. В 2002 году была детально изучена генетика и биохимия плода *rin*-томата на примере сорта Ailsa Craig [4].

Растения томата, гомозиготные по мутации *rin*, образуют недетерминантные соцветия, увеличенные чашелистики, и, главное, их плоды не созревают, имеют зеленую окраску и твердую текстуру. На физиологическом уровне для таких плодов характерны потеря стадий роста, синтеза этилена и климактерического усиления интенсивности дыхания, а также резкое снижение накопления пигментов и ароматических соединений [4, 21]. Однако в целом *rin*-растения сохраняют чувствительность к воздействию этилена, о чем свидетельствует старение лепестков и листьев и опадание цветков; тем не менее, в ответ на экзогенный этилен *rin*-плоды не созревают [4, 68, 69].

В гетерозиготном состоянии мутация *rin* широко используется в селекции сортов томата с повышенной лежкостью [70]. Такие томаты остаются твердыми и не портятся длительный период после сбора урожая, что увеличивает сроки их доставки потребителю и продажи, но при этом нарушается их питательная и вкусовая ценность [4]. Как говорилось выше, мутации гена *RIN* были получены также методом геномного редактирования CRISPR/Cas9 [32, 33].

Ген *RIN* расположен на хромосоме 5, состоит из восьми экзонов и имеет протяженность более 5 т.п.н. За геном *RIN*, отделенным межгенным спейсером (~3 т.п.н.), в той же ориентации следует ген, кодирующий еще один MADS-ТФ – MACROCALYX (*MC*, подсемейство AP1/FUL). Ген *MC* имеет сходную с *RIN* структуру и размеры (8 экзонов, более 5 т.п.н.). Ранее было предположено, что мутация *rin* представляет собой делецию размером 1.7 т.п.н., захватывающую часть последнего интрона 7 и весь экзон 8 гена *RIN*, и также часть межгенной (*RIN-MC*) последовательности [71]. В результате вместо транскриптов *RIN* и *MC* накапливается химерный транскрипт *RIN-MC* (GenBank NCBI ID – NM\_001247047.2) [61]. Таким образом, вышеупомянутая измененная структура чашелистиков и соцветия у растения томата с мутацией *rin*, предположительно, является следствием нарушения структуры не только гена *RIN*, но и гена *MC*, который, подобно другим представителям AP1/FUL, участвует в определении идентичности меристемы цветка, чашелистиков, лепестков и плодолистиков [4, 61].

Особый интерес вызывает тот факт, что *rin*-фенотип может быть связан не только с отсутствием в клетке функционального ТФ RIN, но и с присутствием химерного белка RIN-MC, также являющимся ТФ. Так, химерный транскрипт *RIN-MC* экспрессируется в процессе развития *rin*-плодов на более высоком уровне, чем транскрипты *RIN* и *MC* в плодах дикого типа [61]. Ги-

бидный белок (372 а.о.) содержит MADS-домен, I-область, K-домен и большую часть C-области белка RIN (215 из 242 а.о.), и далее – большую часть I-области, K-домен и C-область белка MC (157 из 219 а.о.) [24, 61]. Показано, что ТФ RIN-MC связывается с известными белками-партнерами ТФ RIN (MADS-ТФ FUL1, FUL2, MADS2 и TAGL1) и, следовательно, потенциально способен *in planta* формировать мультимерные MADS-комплексы, регуляторные эффекты которых, однако, отличаются от эффекта комплексов с включением ТФ RIN [61]. Об этом косвенно свидетельствует то, что у *rin*-растений изменяется паттерн экспрессии множества генов созревания сочного плода [17, 26, 27]. Заметим также, что помимо нарушений транскрипции генов-мишеней ТФ RIN, выявляются новые гены, с промоторами которых способен связываться уже химерный белок RIN-MC [61]. Кроме участия в процессе регуляции созревания, гены-мишени RIN-MC могут определять и другие аспекты развития плода, к примеру, метаболизм аскорбиновой кислоты, структуру клеточных стенок, устойчивость к стрессу и др. [61]. Одно из подтверждений этому является то, что гены метаболизма аскорбиновой кислоты по-разному регулируются RIN и RIN-MC. В частности, при наличии химерного белка активируются гены дегидроаскорбатредуктазы (*DHAR*) и GDP-L-галактозофосфорилазы (*GGP2*), на транскрипцию которых RIN не влияет [61].

Таким образом, в растениях томата дикого типа ТФ RIN является главным регулятором созревания, который контролирует сотни генов, определяющих окраску, текстуру, аромат и вкусовые/питательные качества плода. Делеция фрагмента участка хромосомы V, содержащего тандемно расположенные гены *RIN* и *MC*, приводит к резким морфофизиологическим изменениям в растениях, самым ярким из которых является несозревание плода.

Идентификация и характеристика гена *RIN* у томата вызвали большой интерес у исследователей и послужили началом для поиска ТФ-гомологов RIN, запускающих созревание, и у других видов растений, формирующих сочный плод. Однако, как показал дальнейший опыт, наиболее гомологичный по структуре ген не всегда имеет схожие с *RIN* паттерн экспрессии и функцию (как, например, ген *FaMADS4 F* × *ananassa*). В связи с этим, другой стратегией стал поиск генов MADS-ТФ, которые высоко экспрессируются в зреющем плоде и сверхэкспрессия которых в растениях томата способна комплементировать эффект *rin*-мутации. При соблюдении обоих условий можно считать, что найденный ген выполняет функцию, сходную с функцией *RIN*.

Далее в обзоре приведены примеры таких ТФ, структурная гомология которых с RIN не всегда

максимально высока, но которые выполняют схожие с RIN функции у различных видов растений.

**Банан.** Банан (*M. acuminata* L.), подобно томату, образует климактерический плод. Однако, в отличие от томата, это однодольное растение, поэтому механизмы созревания у этих двух культур могут различаться. Плод банана состоит из двух анатомически разных структур – кожуры и мякоти, имеющих разные паттерны биосинтеза этилена [44, 72]. Синтез этилена начинается в мякоти, и в дальнейшем приводит к инициации его синтеза в коже [44, 73]. Таким образом, в мякоти начинается процесс созревания плода банана.

У образца *M. acuminata* (AAA Cavendish subgroup Grand Nain) были клонированы и описаны шесть кодирующих последовательностей генов-кандидатов на роль гена, определяющего созревание (*MaMADS1* – *MaMADS6*) [44]. Наибольшую гомологию с RIN показали белки *MaMADS2* и *MaMADS1* – 62% и 56% идентичности соответственно [46].

Пространственно-временные паттерны экспрессии идентифицированных генов *MaMADS1–6* различаются в мякоти и коже плода, предполагая существование двух независимых механизмов созревания. Кроме того, различался уровень ответа генов *MaMADS1–6* на воздействие этилена и его синтетического заменителя (1-метилциклопропен, 1-MCP); только транскрипция гена *MaMADS2* не индуцировалась ни этиленом, ни 1-MCP. Это позволило сделать вывод, что транскрипция именно *MaMADS2* активируется в мякоти раньше, чем инициируется биосинтез этилена, аналогично тому, как это происходит с геном *RIN* в плодах томата [44].

Однако, сверхэкспрессия двух генов *MaMADS2* и *MaMADS1* (последний был выбран из-за высокой экспрессии и в мякоти, и в коже) в *rin*-мутантном растении томата не компенсировала отсутствующей функции RIN. А именно, не наблюдалось ожидаемого увеличения синтеза этилена, размягчения плода и накопления каротиноидов; также отсутствовали видимые изменения в развитии цветка и плода [44]. Тем не менее, учитывая, что банан, в отличие от томата, является однодольным, и данные виды эволюционно очень далеки, отсутствие комплементации *rin*-мутации не является корректным доказательством того, что *MaMADS1* и *MaMADS2* не могут играть роль в созревании плода банана, схожую с ролью RIN у томата. Невысокий уровень идентичности белковых последовательностей (особенно, в C-области) данных ТФ с RIN предполагает, что *MaMADS1* и *MaMADS2* могут оказывать неспособными взаимодействовать с белковыми партнерами RIN и, следовательно, регулировать экспрессию генов-мишеней RIN в плодах томата.

С использованием РНК-интерференции и антисмысловой РНК были получены трансгенные растения банана с ограниченной транскрипцией генов *MaMADS2* и *MaMADS1* [46]. Было обнаружено, что у таких растений созревание плодов наступало позже, чем у растений дикого типа. При созревании плоды не становились мягче и не изменяли окраску, при этом увеличивалась их лежкость. Подавление транскрипции генов *MaMADS2* и *MaMADS1* приводило к изменению интенсивности дыхания и уровня синтеза этилена в плодах, а также изменяла экспрессию других *MaMADS* генов [46].

Результаты свидетельствуют, что в отличие от плодов томата, в плодах банана как минимум два *MADS*-ТФ могут играть роль, аналогичную *RIN* [46].

Интересно, что подобно гену *RIN* томата, гены *MaMADS2* и *MaMADS1* получили прикладное использование: у трансгенных растений банана с замалчиванием данных генов замедляется созревание и увеличивается лежкость плодов при хранении [74].

#### *Растения, формирующие неклимактерические плоды*

**Перец.** Перец (род *Capsicum*) относится к семейству *Solanaceae* и, следовательно, являются родственными томату растениями. Интересно, что из шести культивируемых видов перца (*C. annuum* L., *C. chinense* L., *C. frutescens* L., *C. pubescens* Ruiz and Pav., *C. baccatum* L. и *C. assamicum* Purkayastha and L. Singh.) только перец овощной *C. annuum* образует неклимактерические плоды, тогда как для плодов некоторых острых перцев был показан климактерический путь созревания [75–78].

У образца перца *C. annuum* сорта *Vukang* была клонирована и описана кодирующая последовательность гомолога гена *RIN*–*CaMADS-RIN*, содержащая открытую рамку считывания (732 п.н.) и нетранслируемые области 5'-НТО и 3'-НТО длиной 74 п.н. и 236 п.н., соответственно. Данный ген кодирует белок 243 а.о., в составе которого имеются все характерные для *MADS*-ТФ МІКС-типа консервативные структурные домены (*MADS*, *I* и *K*) и варибельная *C*-область [8]. Максимум экспрессии *CaMADS-RIN* перца детектирован в начинающем краснеть и полностью покрасневшем плоде [8].

Для оценки роли ТФ *CaMADS-RIN* в процессе созревания плода, растения томата с *rin*-мутацией были трансформированы кассетой экспрессии транскрипта *CaMADS-RIN* под контролем конститутивного промотора 35S-*CaMV*. Полученные растения томата *rin 35S-CaMADS-RIN* сравнили с растением томата дикого типа и с *rin*-томатом. Было показано, что сверхэкспрессия *CaMADS-RIN*

частично восстанавливала дикий фенотип плода томата, что выражалось в появлении желто-оранжевой окраски плода при созревании и подтверждало участие *CaMADS-RIN* в активации транскрипции генов биосинтеза каротиноидов. Содержание каротиноидов в таких плодах оказалось частично восстановленным и составило 30% от содержания каротиноидов в плодах дикого типа. Скорость созревания плодов *rin 35S-CaMADS-RIN* также возросла почти до уровня дикого типа, значительно превысив такие сроки у *rin*-плодов [8].

Анализ экспрессии основных генов каротиногенеза, которые являются мишенями *RIN*, показал, что у растений *rin 35S-CaMADS-RIN* повысился уровень транскрипции генов фитоиндесадуразы (*PDS*) и ζ-каротиндесадуразы (*ZDS*) по сравнению не только с *rin*-растением, но и с томатом дикого типа. Однако при этом экспрессия гена ключевого фермента метаболизма каротиноидов в плоде – фитоинсинтазы-1 (*PSY1*) снизилась по сравнению и с диким типом, и с *rin*-томатом [8].

Плоды томата со сверхэкспрессией *CaMADS-RIN* по мере созревания приобретали ту же мягкость, что и плоды дикого типа, чем существенно отличались от *rin*-плодов с твердой текстурой. В соответствии с этим изменялась экспрессия генов модификации клеточной стенки. Так, ген полигалактуроназы (*PG*) экспрессировался в плодах растений *rin 35S-CaMADS-RIN* гораздо сильнее, чем в плодах с *rin*-мутацией, хотя и ниже, чем в плодах дикого типа. Также росла транскрипция генов β-галактозидазы-4 (*TBG4*) и α-экспансина-1 (*EXPI*), практически достигая уровня дикого типа [8].

Как было сказано выше, триггером процесса созревания в климактерических плодах является этилен, в то время как в неклимактерических плодах его роль не до конца ясна. Несмотря на то, что перец овощной образует неклимактерические плоды, сверхэкспрессия *CaMADS-RIN* в *rin*-плодах томата способствовала росту концентрации этилена в 1–3 раза по сравнению с *rin*-плодами, но при этом содержание этилена оставалось ниже, чем в плодах дикого типа. Это происходило за счет увеличения экспрессии генов *ACS2*, *ACO1*, *E4* и *E8* [8]. Таким образом, был сделан вывод о том, что ген *CaMADS-RIN* может запускать процессы биосинтеза этилена аналогично *RIN* томата, тем самым регулируя этилен-зависимые пути созревания сочного плода [8].

Чтобы определить, способен ли *CaMADS-RIN* перца регулировать этилен-независимые пути созревания плодов, была измерена экспрессия гена *HDC*, который у томата регулируется транскрипционным фактором *RIN* и нечувствителен к воздействию этилена. В плодах трансгенных растений *rin 35S-CaMADS-RIN* уровень транскрипции гена *HDC* был повышен по сравнению с *rin*-плодами, однако был существенно ниже, чем в пло-

дах дикого типа. Также, сильно росла экспрессия гена ТФ NOR, с промотором которого в норме связывается RIN томата, причем не только в сравнении с *rin*-плодами, но и с плодами дикого типа [8]. Полученные данные указывают на то, что ТФ CaMADS-RIN способен регулировать как этилен-зависимые, так и этилен-независимые пути созревания плода.

Помимо перца овощного, ортологи RIN были выявлены и охарактеризованы у дикорастущих видов перца *C. chinense* и *C. frutescens*. У всех трех видов ген *CaMADS-RIN* экспрессируется максимально в плодах на стадии начала покраснения и в спелых красных плодах. Учитывая, что *C. annuum* образует неклимактерические плоды, а *C. chinense* и *C. frutescens* — климактерические, при том, что паттерны экспрессии *CaMADS-RIN* у всех видов схожи, был сделан вывод о том, что ТФ CaMADS-RIN регулирует созревание обоих типов плодов аналогичным образом [78].

**Виноград.** В геноме винограда (*V. vinifera* L. сорт Pinot noir) найдено два гена-кандидата на роль ортологов гена RIN томата, согласно их структуре, филогении и паттерну экспрессии [52]. Ген *VviSEP4* относится к кладе LOFSEP SEP4 (куда входит и RIN) [37, 38], а *VviSEP3* — к кладе SEP3 [79].

Аналогично *CaMADS-RIN* перца овощного, кодирующие последовательности генов *VviSEP3* и *VviSEP4* были сверхэкспрессированы в трансгенном растении томата, несущем *rin*-мутацию, и в растениях дикого типа. Это привело к изменениям фенотипа спелого плода, подобным тем, как в случае сверхэкспрессии *CaMADS-RIN* [52].

Созревший плод томата с эктопической сверхэкспрессией *VviSEP3* имел более желтую окраску, чем исходный *rin*-плод, что свидетельствовало о распаде хлорофилла-*b* при созревании плода. Однако желтая окраска плода в процессе созревания не становилась красной, как в случае дикого типа, что указывало на отсутствие биосинтеза ликопина, и было подтверждено биохимическим анализом [52]. В свою очередь сверхэкспрессия другого гомолога — гена *VviSEP4* более радикально изменила фенотип спелого плода томата, который приобрел оранжево-красную окраску, но не ярко-красную, как плоды дикого типа, хотя содержание как ликопина, так и бета-каротина в плодах со сверхэкспрессией *VviSEP4* оказалось сопоставимым с таковым в плодах дикого типа [52].

Таким образом, была продемонстрирована способность гена *VviSEP4* максимально компенсировать функцию RIN в *rin*-плодах томата, в большей степени, нежели это может делать ген *VviSEP3*, несмотря на то, что последний структурно ближе гену RIN.

**Земляника.** Земляника (*F. × ananassa* Duch.) является модельной системой для изучения био-

логии неклимактерических плодов. Плоды земляники — ложные ягоды (многоорешки), состоящие из разросшегося сочного цветоложа и орешков на его поверхности. Характерно, что ген земляники *FvMADS9* был идентифицирован с использованием гена RIN томата в качестве зонда. Так же, как и у гена RIN, экспрессия *FvMADS9* специфична для плодов [4].

Сведения о гене *FvMADS9* обширны, но иногда противоречивы [9, 80]. Выключение *FaMADS9* у образца *F. × ananassa* сорт Calypso нарушало развитие лепестков и плодов, а также процесс самоопыления [80]. Цветки таких растений формировали лепестки с зеленой окраской, опадение которых либо задерживалось, либо не происходило вовсе, приводя к тому, что завязавшийся плод не развивался. У трансгенных линий, в которых плодам удалось достичь стадии созревания, данный процесс происходил с изменениями, как в цветоложе, так и в орешках. В зреющих семенах трансгенных линий с нокаутированным геном *FaMADS9* хлорофилл не разрушался, и плоды были значительно тверже, чем у растений дикого типа. Так, накопление антоцианов в цветоложе задерживалось на 10 дней и происходило неравномерно, а их содержание всегда было меньше по сравнению с растениями дикого типа. Чем ниже был уровень экспрессии гена *FaMADS9*, тем больше фенотипических отклонений детектировалось [80].

Интересно, что замалчивание транскрипции *FaMADS9* у растений земляники другого сорта (Camagosa) не приводило к существенному изменению фенотипа. Плоды оставались такими же красными и мягкими, как и плоды дикого типа, однако имели гораздо более низкое содержание растворимых сухих веществ [9]. Тем не менее, при сравнении данных транскриптомного анализа плодов сорта Camagosa с выключенной экспрессией *FaMADS9* с плодами дикого типа было выявлено 2670 дифференциально экспрессирующихся генов на стадии белого плода, и 1943 — на стадии красного плода [9]. Среди найденных генов выделено несколько функциональных групп. Первую (82%) составили ТФ, в частности ТФ ауксинового ответа. Следующая большая группа генов связана с процессами роста клеток и энергетическим метаболизмом, что указывает на важную роль *FaMADS9* в процессах роста цветоложа на ранних этапах его развития. Третья группа генов оказалась связана с транспортом. Также у трансгенных линий изменялась экспрессия генов  $\beta$ -амилаз и изоамилазы (что приводило к нарушениям в метаболизме крахмала), полигалактозураназ и генов биосинтеза жирных кислот, а также снижалась экспрессия генов биосинтеза аскорбиновой кислоты *GME* и *VTC1* (из-за чего уменьшалось содержание аскорбата) [9]. Все эти данные могут помочь составить представление не только о роли *FaMADS9* в про-

цессе созревания плода, но и о соответствующих регуляторных механизмах.

В отличие от гена *RIN* томата, мутация в котором приводит только к изменению созревания плода, замалчивание или снижение экспрессии гена *FaMADS9* приводило к нарушению и более ранних этапов развития плода [80]. Следует отметить, что земляника является октоплоидом, и чем больше аллелей затрагивал нокаут, тем в большей степени были нарушены процессы развития плода, вплоть до полного отсутствия его завязывания [80]. Допустимо поэтому, что ген земляники *FaMADS9*, в отличие от *RIN* томата, имеет более широкий функциональный спектр. К примеру, способность регулировать транскрипцию измененного, расширенного набора генов-мишеней, взаимодействовать с другими и/или дополнительными белковыми партнерами и иметь специфичные GArG-консенсусы в промоторах регулируемых генов.

Фенотип лепестков земляники с выключенным *FaMADS9* (зеленая окраска, отсутствие опадения) соотносится с фенотипом лепестков томата с замалчиванием гена ТФ *TM29* клады *SEP1/2* [80]. С другой стороны, данные об отсутствии выраженного фенотипа, полученные в исследовании [9], могут указывать на неспецифичность сайленсинга гена *FaMADS9* в исследовании [80]: поскольку *MADS*-гены имеют консервативную структуру, могло произойти дополнительное замалчивание какого-либо другого *MADS*-гена (генов), помимо *FaMADS9* [9].

#### АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И БУДУЩИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ

**Идентификация генов гомологов *RIN* у новых видов растений.** На сегодняшний день подавляющее большинство исследований, предметом которых являются ТФ *RIN* или кодирующий его ген, сфокусированы только на культивируемых видах широко используемых сельскохозяйственных растений (а именно плодах экономически значимых овощей и фруктов). Однако, чтобы лучше понять эволюцию, структуру и функции данного белка, необходима идентификация гомологичных генов у дикорастущих родственных видов. Сравнительная структурная и функциональная характеристика генов-гомологов *RIN* и кодируемых ими ТФ *RIN* культивируемых растений (для которых имеется детальное описание признаков сочного плода) и гомологичных генов дикорастущих родственных видов (плоды которых характеризуются нарушением отдельных аспектов созревания, в силу чего они несъедобны) может расширять наши представления о природе ТФ *RIN* и регулируемых им генах.

Помимо томата обыкновенного (*S. lycopersicum*) к секции *Lycopersicon* относят 12 дикорасту-

щих родственных видов томата, которые также образуют сочный плод. Процесс созревания у наиболее древних видов томата отличается от такового у томата обыкновенного: не накапливаются каротиноиды и моносахара, сроки развития плодов существенно увеличены [81, 82]. По многим морфологическим и биохимическим характеристикам плоды дикорастущих видов томата напоминают плоды *rin*-мутанта культивируемого томата. Идентификация генов *RIN* дикорастущих видов, сравнение их структуры и аллельной вариативности с геном *RIN* томата обыкновенного и *rin*-мутантных растений *S. lycopersicum* даст возможность понять эволюцию данного транскрипционного фактора и его участие в доместикации растений, а также определит дальнейшие перспективы для биотехнологического применения. Проведенный ранее анализ межвидовой вариативности и экспрессии некоторых структурных генов созревания, которые являются мишенями ТФ *RIN* у дикорастущих видов и культивируемых сортов томата, показал наличие дифференциальной экспрессии у образцов с различными характеристиками созревания плода [83–86]. Подобные результаты могут быть объяснены не только структурной вариативностью самих генов биосинтеза каротиноидов и метаболизма сахаров и промоторов этих генов, но и различиями в структуре и активности контролирующего их ТФ *RIN*, что в дальнейшем предстоит определить.

#### Поиск факторов, регулирующих активность *RIN*.

Среди имеющихся на сегодня данных оказалось крайне сложно найти информацию о факторах, регулирующих работу самого *RIN*. Очевидно, что ТФ *RIN* является одним из ключевых регуляторов созревания, но полная картина о том, какие внешние или внутренние факторы задействованы в транскрипционной регуляции кодирующего его гена, только формируется. Исследование механизмов, лежащих в основе регуляции транскрипции *RIN*, позволит управлять процессом созревания сочного плода, что, несомненно, имеет важное прикладное значение.

Несмотря на то, что направленные исследования вышестоящих (upstream) регуляторов *RIN* не проводились, за последние несколько лет при описании белков различных семейств, экспрессирующихся в плодах, среди прочих функций была показана возможность их непосредственного или опосредованного влияния на транскрипцию гена *RIN* и/или активность ТФ *RIN*.

Найденные факторы можно разделить на две группы: (1) белки, связанные с эпигенетическими модификациями ДНК и гистонов; (2) — другие белки, связанные с синтезом отдельных метаболитов, и данные метаболиты (сахара, каротиноиды, гормоны, мелатонин).

В процессе созревания и старения растительных плодов могут происходить эпигенетические модификации [87, 88]. К примеру, у томата ингибирование активности ДНК-метилтрансфераз приводит к преждевременному созреванию плода [88]. Важным фактором, определяющим структурную организацию хроматина и экспрессию генов, является метилирование и деметилирование гистонов, которое осуществляется гистоновыми лизинметилтрансферазами и деметилазами [88].

В геноме томата найдено 25 гистоновых деметилаз (HDMs); экспрессия многих из них коррелирует с запуском процесса созревания плода [88]. На сегодняшний день получены данные, свидетельствующие о достоверном влиянии одной из таких гистоновых деметилаз — SIJMJ6, на процессы созревания плода томата [88]. SIJMJ6 ускоряет созревание плодов в результате деметилирования H3K27me<sub>3</sub>, что приводит к активации экспрессии 32 генов, контролируемых, в том числе, созревание [88]. Наибольший интерес представляет то, что SIJMJ6 может деметилировать участок хроматина, содержащий *RIN*, что активирует его экспрессию. Важным представляется и тот факт, что помимо этого, гистоновая деметилаза SIJMJ6 способна активировать и экспрессию генов-мишеней ТФ *RIN* (рис. 1) [88].

На примере плодов томата также показано, что на скорость созревания может влиять и ацетилирование гистонов. Снижение экспрессии гена гистоновой деацетилазы *SIHDA3* ускоряет созревание плодов за счет увеличения экспрессии генов биосинтеза и сигнальных путей этилена, некоторых каротиноидов, генов модификации клеточной стенки, а также генов ТФ *RIN*, *CNR* и *TAGL1* [89]. Однако обращает на себя внимание то, что среди генов созревания, чья экспрессия изменилась после ограничения работы *SIHDA3*, большинство являются мишенями ТФ *RIN*. Таким образом, можно предположить, что полученные результаты являются не следствием непосредственной регуляции экспрессии этих генов за счет ацетилирования/деацетилирования гистонов, а скорее следствием активации или деактивации экспрессии гена *RIN* при изменении активности гистоновой ацетилазы *SIHDA3*, которая является негативным регулятором *RIN*. Однако остается неясным, могут ли другие гистоновые деацетилазы и ацетилтрансферазы оказывать на экспрессию *RIN* аналогичное действие (то есть всегда ли ацетилирование гистонов приводит к активации *RIN*), либо этот ген регулируется специфично за счет работы *SIHDA3* (рис. 1).

Не менее важно отметить, что подобно модификации гистоновых белков, фактором активации гена *RIN* также является деметилирование ДНК. В частности, показано, что специфичная для плодов ДНК-деметилаза *DML2* активирует

экспрессию генов главных регуляторов созревания — ТФ *RIN*, *NOR* и *CNR*, за счет уменьшения метилирования ДНК [90, 91]. Интересно, что экспрессия гена *DML2* была сильно увеличена в плодах растений томата со сверхэкспрессией гена гистоновой деметилазы SIJMJ6 по сравнению с плодами дикого типа. Более того, показано, что SIJMJ6 напрямую связывается с локусом *DML2*, снимает метилирование H3K27me<sub>3</sub>, в результате чего происходит активация транскрипции *DML2*, а кодируемый белок *DML2*, в свою очередь, снимает метилирование с ДНК-последовательности *RIN*, что приводит к активации его экспрессии (рис. 1) [88].

Таким образом, можно сделать вывод, что эпигенетические модификации ДНК и гистоновых белков являются одним из факторов, запускающих экспрессию гена *RIN*. Однако неясным остается, какие еще гистоновые деметилазы (помимо SIJMJ6), которых у томата описано 25 и подавляющее большинство которых активируется именно в процессе развития и созревания плодов, участвуют в активации гена *RIN*.

Что касается других видов растений, данные о конкретных регуляторах экспрессии гомологов *RIN* не найдены, однако для них доступны общие данные по изменению динамики метилирования ДНК в процессе созревания. Принято считать, что у климактерических плодов (показано на примере томата), процесс созревания сопровождается снятием метилирования ДНК за счет увеличения экспрессии генов ДНК-деметилаз [92]. У неклимактерических плодов (показано на примере земляники) процесс созревания также сопровождается деметилированием ДНК, однако у них не наблюдается увеличения экспрессии генов ДНК-деметилаз, но подавляется экспрессия генов, участвующих в РНК-направленном метилировании ДНК [92]. В отличие от томата и земляники, у другого неклимактерического растения — апельсина, процесс созревания плода принципиально иной и сопровождался глобальным метилированием ДНК, предположительно, за счет уменьшения экспрессии генов ДНК деметилаз [93].

Помимо эпигенетических факторов на активацию *RIN* и созревание плодов могут оказывать влияние некоторые отдельные метаболиты. Прежде всего, это простые сахара, которые выступают не только, как энергетический субстрат клетки, но и как сигнальные молекулы, а также каротиноиды, фитогормоны и другие метаболиты.

Известно, что в регуляции внутриклеточного сигнала и метаболизма сахаров при созревании плода участвует протеинкиназа SnRK1 [94]. Так, гетерологичная сверхэкспрессия генов *MhSnRK1* (яблоня) и *PpSnRK1α* (персик) в растениях томата приводила к изменению характеристик спелого плода, увеличению количества растворимых са-

харов и крахмала и уменьшению сроков созревания [94–96]. Наличие прямого взаимодействия между PpSnRK1 $\alpha$  и ТФ RIN было подтверждено *in vivo* и *in vitro*. Более того, сверхэкспрессия гена PpSnRK1 $\alpha$  также вызывала увеличение уровня экспрессии не только гена RIN, но и его генов-мишеней (NOR, FULL, ACS2, ACS4, E8) [94]. Исходя из этого, следует, что протеинкиназа PpSnRK1 $\alpha$  взаимодействует с ТФ RIN, увеличивая экспрессию кодирующего гена RIN, и, следовательно, генов-мишеней ТФ RIN, тем самым участвуя в контроле созревания. Таким образом, SnRK1 $\alpha$  может выступать регулятором активности RIN как на белковом, так и на транскрипционном уровне (рис. 1). Возможно, SnRK1 способна фосфорилировать белок RIN, однако, остается вопрос о том, влияет ли SnRK1 напрямую на гены-мишени ТФ RIN, или же это происходит опосредованно. Кроме того, активность SnRK1 в клетке приводит к увеличению интенсивности фотосинтеза и, как следствие, накоплению сахаров и других важных метаболитов. Могут ли они в свою очередь также послужить активатором RIN – еще предстоит выяснить.

Другой фермент, фитоиндесатураза PDS участвует в биосинтезе каротиноидов; снижение экспрессии гена PDS в плодах томата помимо сокращения содержания каротиноидов, приводило к уменьшению экспрессии гена RIN, а также ряда других генов созревания (большинство из которых являются мишенями ТФ RIN) [97]. Была показана корреляция между экспрессией генов PDS и RIN, но не ясно, за счет каких молекулярных механизмов это происходит (рис. 1). Можно предположить, что имеет место либо непосредственное взаимодействие между белками PDS и ТФ RIN (или PDS и геном RIN), либо отсутствие каротиноидов приводит к изменению концентрации других метаболитов и белков, которые в свою очередь репрессируют экспрессию гена RIN. Например, каротиноиды могут быть предшественниками для биосинтеза абсцизовой кислоты, которая потенциально может служить регулятором экспрессии RIN. Также можно предположить наличие обратной взаимосвязи между конечными продуктами реакций, которые осуществляют структурные гены созревания (мишени ТФ RIN) и активацией/репрессией самого гена RIN.

Помимо широко изученных метаболитов, связанных с созреванием плода, обращают на себя внимание новые мало описанные соединения, например, мелатонин (N-цетил-5-метокситриптамин). У томата обработка экзогенным мелатонином приводила к ускоренному созреванию плода и улучшению питательных характеристик [98]. Сравнение протеомов растений томата, обработанных экзогенным мелатонином, и контрольных растений показало, что среди других белков, концентрации которых существенно от-

личаются у двух групп образцов, есть и белок ТФ RIN, количество которого у образца, обработанного мелатонином, было выше, чем у контрольного растения [98]. Таким образом, на уровне белка показана корреляция количества мелатонина и ТФ RIN, но неясными остаются молекулярные механизмы данного явления: оказывает мелатонин прямое или опосредованное через другие метаболиты, белки или эпигенетические факторы действие на активацию экспрессии гена RIN (рис. 1).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем обзоре изложены сведения о функциях транскрипционного фактора RIN томата и его гомологах у растений различных видов и семейств. Приведенные данные свидетельствуют о том, что MADS-белки подсемейства SEP играют центральную роль в чрезвычайно сложной транскрипционной регуляции каскада реакций созревания как климактерических, так и неклимактерических плодов однодольных и двудольных растений. Генная сеть, контролируемая SEP-белками, включает в себя не только регуляторные и структурные гены различных семейств, но и некодирующие РНК-последовательности – микроРНК и днкРНК. С помощью данной сети происходит регуляция путей биосинтеза фитогормонов, витаминов, пигментов и других вторичных метаболитов и биологически активных соединений, что, в свою очередь, определяет время созревания, текстуру, окраску и биохимию плода. Важно понимать, что в основе морфологического многообразия сочного плода различных видов высших растений может лежать эволюционная дупликация и диверсификация MADS-генов подсемейства SEP. При этом разные виды растений могли задействовать SEP-гены различных клад, а не только SEP4-гены, к которым принадлежит ген томата RIN. Кроме того, также возможно существование видов растений, где RIN-функцию выполняет не один, а несколько SEP-паралогов. Наконец, события дупликации и диверсификации происходили не только с SEP-генами, но и другими MADS-генами, поэтому всегда необходимо учитывать функции и структурные особенности MADS-партнеров SEP-ТФ, совместно с которыми осуществляется регуляция процессов, происходящих при созревании плода.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-76-00006) и, частично, Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Karlova R., Chapman N., David K., Angenent G.C., Seymour G.B., de Maagd R.A. Transcriptional control of fleshy fruit development and ripening // J. Exp. Bot. 2014. V. 65. P. 4527.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/eru316>
2. Valenta K., Kalbitzer U., Razafimandimby D., Omeja P., Ayasse M., Chapman C.A., Nevo O. The evolution of fruit colour: phylogeny, abiotic factors and the role of mutualists // Sci. Rep. 2018. V. 8: 14302.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-32604-x>
3. Hewitt S., Dhingra A. Beyond Ethylene: New Insights Regarding the Role of Alternative Oxidase in the Respiratory Climacteric // Front. Plant Sci. 2020. V. 11: 543958.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.543958>
4. Vrebalov J., Ruezinsky D., Padmanabhan V., White R., Medrano D., Drake R., Schuch W., Giovannoni J. A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (rin) locus // Science. 2002. V. 296. P. 343.
5. Alexander L., Grierson D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening // J. Exp. Bot. 2002. V. 53. P. 2039.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erf072>
6. Chervin C., El-Kereamy A., Roustan J.P., Latche A., Lamon J., Bouzayen M. Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape, a non-climacteric fruit // Plant Science. 2004. V. 167. P. 1301.
7. Cazzonelli C.I., Cavallaro A.S., Botella J.R. Cloning and characterisation of ripening-induced ethylene biosynthetic genes from non-climacteric pineapple (*Ananas comosus*) fruits // Funct. Plant Biol. 1998. V. 25. P. 513.  
<https://doi.org/10.1071/PP98013>
8. Dong T., Chen G., Tian S., Xie Q., Yin W., Zhang Y., Hu Z. A non-climacteric fruit gene *CaMADS-RIN* regulates fruit ripening and ethylene biosynthesis in climacteric fruit // PloS One. 2014. V. 9: e95559.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095559>
9. Vallarino J.G., Merchante C., Sánchez-Sevilla J.F., de Luis Balaguer M.A., Pott D.M., Ariza M.T., Casañal A., Posé D., Vioque A., Amaya I., Willmitzer L., Solano R., Sozzani R., Fernie A.R., Botella M.A., Giovannoni J.J., Valpuesta V., Osorio S. Characterizing the involvement of *FaMADS9* in the regulation of strawberry fruit receptacle development // Plant Biotechnol. J. 2020. V. 18. P. 929.  
<https://doi.org/10.1111/pbi.13257.20>
10. Csukasi F., Osorio S., Gutierrez J.R., Kitamura J., Giavalisco P., Nakajima M., Fernie A.R., Rathjen J.P., Botella M.A., Valpuesta V., Medina-Escobar N. Gibberellin biosynthesis and signalling during development of the strawberry receptacle // New Phytol. 2011. V. 191. P. 376.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03700.x>
11. Chai Y.M., Jia H.F., Li C.L., Dong Q.H., Shen Y.Y. Fa-PYR1 is involved in strawberry fruit ripening // J. Exp. Bot. 2011. V. 62. P. 5079.
12. Jia H., Chai Y., Li C., Lu D., Luo J., Qin L., Shen Y. Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening // Plant Physiol. 2011. V. 157. P. 188.
13. Concha C.M., Figueroa N.E., Poblete L.A., Oñate F.A., Schwab W., Figueroa C.R. Methyl jasmonate treatment induces changes in fruit ripening by modifying the expression of several ripening genes in *Fragaria chiloensis* fruit // Plant Physiol. Biochem. 2013. V. 70. P. 433.
14. Chai Y.M., Zhang Q., Tian L., Li C.L., Xing Y., Qin L., Shen Y.Y. Brassinosteroid is involved in strawberry fruit ripening // Plant Growth Regul. 2013. V. 69. P. 63.
15. Perkins-Veazie P. Growth and ripening of strawberry fruit // Hortic. Rev. 1995. V. 17. P. 267.
16. Merchante C., Vallarino J.G., Osorio S., Aragüez I., Villarreal N., Ariza M.T., Martínez G.A., Medina-Escobar N., Civello M.P., Fernie A.R., Botella M.A., Valpuesta V. Ethylene is involved in strawberry fruit ripening in an organ-specific manner // J. Exp. Bot. 2013. V. 64. P. 4421.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/ert257>
17. Fujisawa M., Shima Y., Nakagawa H., Kitagawa M., Kimbara J., Nakano T., Kasumi T., Ito Y. Transcriptional regulation of fruit ripening by tomato FRUITFULL homologs and associated MADS box proteins // Plant Cell. 2014. V. 26. P. 89.
18. Alvarez-Buylla E.R., Pelaz S., Liljgren S.J., Gold S.E., Burgeff C., Ditta G.S., Ribas de Pouplana L., Martínez-Castilla L., Yanofsky M.F. An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals // PNAS. 2000. V. 97. P. 5328.
19. Parenicová L., de Folter S., Kieffer M., Horner D.S., Favalli C., Busscher J., Cook H.E., Ingram R.M., Kaier M.M., Davies B., Angenent G.C., Colombo L. Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world // Plant Cell. 2003. V. 15. P. 1538.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.011544>
20. Robinson R., Tomes M. Ripening inhibitor: a gene with multiple effect on ripening Tomato // Genet. Coop. 1968. V. 18. P. 36.
21. Tigchelaar E., Tomes M., Kerr E., Barman R. A new fruit ripening mutant, non-ripening (nor) // Rep. Tomato Genet. Coop. 1973. V. 23. P. 33.
22. Thompson A.J., Tor M., Barry C.S., Vrebalov J., Orfila C., Jarvis M.C., Giovannoni J.J., Grierson D., Seymour G.B. Molecular and genetic characterization of a novel pleiotropic tomato-ripening mutant // Plant Physiol. 1999. V. 120. P. 383.
23. Zhong S., Fei Z., Chen Y.R., Zheng Y., Huang M., Vrebalov J., McQuinn R., Gapper N., Liu B., Xiang J., Shao Y., Giovannoni J.J. Single-base resolution methylomes of tomato fruit development reveal epigenome modifications associated with ripening // Nat. Biotechnol. 2013. V. 31. P. 154.
24. Wang R., Angenent G.C., Seymour G., de Maagd R.A. Revisiting the Role of Master Regulators in Tomato Ripening // Trends Plant Sci. 2020. V. 25. P. 291.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.11.005>
25. Wang R., Lammers M., Tikunov Y., Bovy A.G., Angenent G.C., de Maagd R.A. The rin, nor and Cnr spontaneous mutations inhibit tomato fruit ripening in additive and epistatic manners // Plant Sci. 2020. V. 294: 110436.  
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110436>

26. Fujisawa M., Nakano T., Shima Y., Ito Y. A large-scale identification of direct targets of the tomato MADS box transcription factor RIPENING INHIBITOR reveals the regulation of fruit ripening // *Plant Cell*. 2013. V. 25. P. 371.
27. Qin G., Wang Y., Cao B., Wang W., Tian S. Unraveling the regulatory network of the MADS box transcription factor RIN in fruit ripening // *Plant J*. 2012. V. 70. P. 243.
28. Osorio S., Alba R., Damasceno C.M., Lopez-Casado G., Lohse M., Zanol M.I., Tohge T., Usadel B., Rose J.K., Fei Z., Giovannoni J.J., Fernie A.R. Systems biology of tomato fruit development: combined transcript, protein, and metabolite analysis of tomato transcription factor (*nor*, *rin*) and ethylene receptor (*Nr*) mutants reveals novel regulatory interactions // *Plant Physiol*. 2011. V. 157. P. 405.
29. Ito Y. Regulation of Tomato Fruit Ripening by MADS-Box Transcription Factors // *Horticulture*. 2016. V. 50. P. 33.
30. Azzi L., Deluche C., Gévaudant F., Frangne N., Delmas F., Hernould M., Chevalier C. Fruit growth-related genes in tomato // *J. Exp. Bot*. 2015. V. 66. P. 1075. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru527>
31. Li S., Chen K., Grierson D. A critical evaluation of the role of ethylene and MADS transcription factors in the network controlling fleshy fruit ripening // *New Phytol*. 2019. V. 221. P. 1724. <https://doi.org/10.1111/nph.15545>
32. Ito Y., Nishizawa-Yokoi A., Endo M., Mikami M., Toki S. CRISPR/ Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2015. V. 467. P. 76. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.09.117>
33. Ito Y., Nishizawa-Yokoi A., Endo M., Mikami M., Shima Y., Nakamura N., Kotake-Nara E., Kawasaki S., Toki S. Re-evaluation of the *rin* mutation and the role of RIN in the induction of tomato ripening // *Nature Plants*. 2017. V. 3. P. 866. <https://doi.org/10.1038/s41477-017-0041-5>
34. Li S., Zhu B., Pirrello J., Xu C., Zhang B., Bouzayen M., Chen K., Grierson D. Roles of RIN and ethylene in tomato fruit ripening and ripening-associated traits // *New Phytol*. 2020. V. 226. P. 460. <https://doi.org/10.1111/nph.16362>
35. Ito Y., Sekiyama Y., Nakayama H., Nishizawa-Yokoi A., Endo M., Shima Y., Nakamura N., Kotake-Nara E., Kawasaki S., Hirose S., Toki S. Allelic Mutations in the Ripening-Inhibitor Locus Generate Extensive Variation in Tomato Ripening // *Plant Physiol*. 2020. V. 183. P. 80. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00020>
36. Gao Y., Zhu N., Zhu X., Wu M., Jiang C.Z., Grierson D., Luo Y., Shen W., Zhong S., Fu D.Q., Qu G. Diversity and redundancy of the ripening regulatory networks revealed by the fruitENCODE and the new CRISPR/Cas9 CNR and NOR mutants // *Hortic Res*. 2019. V. 6: 39. <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0122-x>
37. Malcomber S.T., Kellogg E.A. SEPALLATA gene diversification: brave new whorls // *Trends Plant Sci*. 2005. V. 10. P. 427. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.07.008>
38. Díaz-Riquelme J., Lijavetzky D., Martínez-Zapater J.M., Carmona M.J. Genome-wide analysis of MIKCC -type MADS box genes in grapevine. *Plant Physiol*. 2009. V. 149. P. 354. <https://doi.org/10.1104/pp.108.131052>
39. Shore P., Sharrocks A.D. The MADS-box family of transcription factors // *Eur. J. Biochem*. 1995. V. 229. P. 1.
40. Huang K., Louis J.M., Donaldson L., Lim F.L., Sharrocks A.D., Clore G.M. Solution structure of the MEF2A-DNA complex: structural basis for the modulation of DNA bending and specificity by MADS-box transcription factors // *EMBO J*. 2000. V. 19. P. 2615.
41. Egea-Cortines M., Saedler H., Sommer H. Ternary complex formation between the MADS-box proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is involved in the control of floral architecture in *Antirrhinum majus* // *EMBO J*. 1999. V. 19. P. 5370. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.19.5370>
42. Garcia-Maroto F., Carmona M.-J., Garrido J.-A., Vilches-Ferron M., Rodriguez-Ruiz J., Alonso L.D. New roles for MADS-box genes in higher plants // *Biologia Plantarum*. 2003. V. 46. P. 321.
43. De Bodt S., Raes J., Florquin K., Rombauts S., Rouzé P., Theissen G., Van de Peer Y. Genomewide structural annotation and evolutionary analysis of the type I MADS-box genes in plants // *J. Mol. Evol*. 2003. V. 56. P. 573.
44. Elitzur T., Vrebalov J., Giovannoni J.J., Goldschmidt E.E., Friedman H. The regulation of MADS-box gene expression during ripening of banana and their regulatory interaction with ethylene // *J. Exp. Bot*. 2010. V. 61. P. 1523. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq017>
45. Sluginina M.A., Dyachenko E.A., Kochieva E.Z., Shchennikova A.V. Structural and Functional Diversification of SEPALLATA Genes TM5 and RIN in Tomato Species (Section Lycopersicon) // *Dokl. Biochem. Biophys*. 2020. V. 492. P. 152. <https://doi.org/10.1134/S1607672920030102>
46. Elitzur T., Yakir E., Quansah L., Zhangjun F., Vrebalov J., Khayat E., Giovannoni J.J., Friedman H. Banana Ma-MADS Transcription Factors Are Necessary for Fruit Ripening and Molecular Tools to Promote Shelf-Life and Food Security // *Plant Physiol*. 2016. V. 171. P. 380. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01866>
47. Sánchez-Sevilla J.F., Vallarino J.G., Osorio S., Bombarely A., Posé D., Merchant C., Botella M.A., Amaya I., Valpuesta V. Gene expression atlas of fruit ripening and transcriptome assembly from RNA-seq data in octoploid strawberry (*Fragaria × ananassa*) // *Sci. Rep*. 2017. V. 7: 13737.
48. Boss P.K., Sensi E., Hua C., Davies C., Thomas M.R. Cloning and characterisation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) MADS-box genes expressed during inflorescence and berry development // *Plant Sci*. 2002. V. 162. P. 887.
49. Deluc L.G., Grimplet J., Wheatley M.D., Tillett R.L., Quilici D.R., Osborne C., Schooley D.A., Schlauch K.A., Cushman J.C., Cramer G.R. Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development // *BMC Genomics*. 2007. V. 8: 429

50. Pilati S., Perazzolli M., Malossini A., Cestaro A., Dematè L., Fontana P., Dal Ri A., Viola R., Velasco R., Moser C. Genome-wide transcriptional analysis of grapevine berry ripening reveals a set of genes similarly modulated during three seasons and the occurrence of an oxidative burst at véraison // *BMC Genomics*. 2007. V. 8: 428. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-428>
51. Zenoni S., Ferrarini A., Giacomelli E., Xumerle L., Fasoli M., Malerba G., Bellin D., Pezzotti M., Delledonne M. Characterization of transcriptional complexity during berry development in *Vitis vinifera* using RNA-Seq // *Plant Physiol*. 2010. V. 152. P. 1787. <https://doi.org/10.1104/pp.109.149716>
52. Mellway R.D., Lund S.T. Interaction analysis of grapevine MIKCC-type MADS transcription factors and heterologous expression of putative véraison regulators in tomato // *J. Plant Physiol*. 2013. V. 16. P. 1424.
53. Tranbarger T.J., Dussert S., Joët T., Argout X., Summo M., Champion A., Cros D., Omore A., Nouy B., Morcillo F. Regulatory mechanisms underlying oil palm fruit mesocarp maturation, ripening, and functional specialization in lipid and carotenoid metabolism // *Plant Physiol*. 2011. V.156. P. 564.
54. Moyle R.L., Koia J.H., Vrebalov J., Giovannoni J., Botella J.R. The pineapple *AcMADS1* promoter confers high level expression in tomato and *Arabidopsis* flowering and fruiting tissues, but *AcMADS1* does not complement the tomato *LeMADS-RIN* (*rin*) mutant // *Plant Mol. Biol*. 2014. V. 86. P. 395. <https://doi.org/10.1007/s11103-014-0236-3>
55. Ito Y., Kitagawa M., Ihashi N., Yabe K., Kimbara J., Yasuda J., Ito H., Inakuma T., Hiroi S., Kasumi T. DNA-binding specificity, transcriptional activation potential, and the *rin* mutation effect for the tomato fruit-ripening regulator *RIN* // *Plant J*. 2008. V. 26. P. 212. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03491.x>
56. Fujisawa M., Nakano T., Ito Y. Identification of potential target genes for the tomato fruit-ripening regulator *RIN* by chromatin immunoprecipitation // *BMC Plant Biol*. 2011. V. 11: 26. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-26>
57. Robles P., Pelaz S. Flower and fruit development in *Arabidopsis thaliana* // *Int. J. Dev. Biol*. 2005. V. 49. P. 633. <https://doi.org/10.1387/ijdb.052020pr>
58. Leseberg C.H., Eissler C.L., Wang X., Johns M.A., Duvall M.R., Mao L. Interaction study of MADS-domain proteins in tomato // *J. Exp. Bot*. 2008. V. 59. P. 2253. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern094>
59. Shima Y., Fujisawa M., Kitagawa M., Nakano T., Kimbara J., Nakamura N., Shiina T., Sugiyama J., Nakamura T., Kasumi T., Ito Y. Tomato FRUITFULL homologs regulate fruit ripening via ethylene biosynthesis // *Biosci., Biotechnol., Biochem*. 2014. V. 72. P. 231. <https://doi.org/10.1080/09168451.2014.878221>
60. Fujisawa M., Shima Y., Higuchi N., Nakano T., Koyama Y., Kasumi T., Ito Y. Direct targets of the tomato-ripening regulator *RIN* identified by transcriptome and chromatin immunoprecipitation analyses // *Planta*. 2012. V. 235. P. 1107.
61. Li S., Xu H., Ju Z., Cao D., Zhu H., Fu D., Grierson D., Qin G., Luo Y., Zhu B. The *RIN-MC* Fusion of MADS-Box Transcription Factors Has Transcriptional Activity and Modulates Expression of Many Ripening Genes // *Plant Physiol*. 2018. V. 176. P. 891. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01449>
62. Collin V., Lamkemeyer P., Miginiac-Maslow M., Hirasa-wa M., Knaff D.B., Dietz K.J., Issakidis-Bourguet E. Characterization of plastidial thioredoxins from *Arabidopsis* belonging to the new y-type // *Plant Physiol*. 2004. V. 136. P. 4088. <https://doi.org/10.1104/pp.104.052233>
63. Gao C., Ju Z., Cao D., Zhai B., Qin G., Zhu H., Fu D., Luo Y., Zhu B. MicroRNA profiling analysis throughout tomato fruit development and ripening reveals potential regulatory role of *RIN* on microRNAs accumulation // *Plant Biotechnol. J*. 2015. V. 13. P. 370.
64. Yu T., Tzeng D.T.W., Li R., Chen J., Zhong S., Fu D., Zhu B., Luo Y., Zhu H. Genome-wide identification of long non-coding RNA targets of the tomato MADS box transcription factor *RIN* and function analysis // *Ann. Bot*. 2019. V. 123. P. 469. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy178>
65. Jin J., Liu J., Wang H., Wong L., Chua N.-H. PLncDB: plant long non-coding RNA database // *Bioinformatics*. 2013. V. 29. P. 1068.
66. Quinet M., Angosto T., Yuste-Lisbona F.J., Blanchard-Gros R., Bigot S., Martinez J.P., Lutts S. Tomato Fruit Development and Metabolism // *Front. Plant Sci*. 2019. V. 10:1554. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01554>
67. Tomato Genome Consortium. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution // *Nature*. 2012. V. 485. P. 635. PMID: ; PMID: PMC3378239. <https://doi.org/10.1038/nature111922660326>
68. Lincoln J.E., Fischer R.L. Regulation of Gene Expression by Ethylene in Wild-Type and *rin* Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Fruit // *Plant Physiol*. 1988. V. 88. P. 370. <https://doi.org/10.1104/pp.88.2.370>
69. Yen H.-C., Lee S., Tanksley S.D., Lanahan M.B., Klee H.J., Giovannoni J.J. The tomato *Never-ripe* locus regulates ethylene-inducible gene expression and is linked to a homolog of the *Arabidopsis ETR1* gene // *Plant Physiol*. 1995. V. 107. P. 1343.
70. Kuzmina Y. Methods of genome editing for increasing the shelf life of tomato fruit // *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020. V. 3. P. 31. <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2020-1-o6>
71. Giovannoni J.J. Genetic regulation of fruit development and ripening // *The Plant Cell*. 2004. V. 16. P. 170.
72. Clendennen S.K., Kipp P.B., May G.D. The role of ethylene in banana fruit ripening // *Biology and biotechnology of the plant hormone ethylene* / Ed. Kanellis A.K. Kluwer Academic Publishers, 1997. P. 141.
73. Dominguez M., Vendrell M. Ethylene biosynthesis in banana fruit: evolution of EFE activity and ACC levels in peel and pulp during ripening // *J. Hortic. Sci*. 1993. V. 68. P. 63.
74. Giovannoni J., Friedman H., Vrebalov J., Elitzur T. US Patent № US20130036515A1, 2013.
75. Villavicencio L., Blankenship S., Sanders D., Swallow W. Ethylene and carbon dioxide production in detached fruit of selected pepper cultivars // *J. Am. Soc. Hortic. Sci*. 1999. V. 124. P. 402.

76. Paul V., Pandey R., Srivastava G.C. The fading distinctions between classical patterns of ripening in climacteric and non-climacteric fruit and the ubiquity of ethylene // *J. Food Sci. Technol.* 2012. V. 49. P. 1.
77. Hou B.-Z., Li C.-L., Han Y.-Y., Shen Y.-Y. Characterization of the hot pepper (*Capsicum frutescens*) fruit ripening regulated by ethylene and ABA // *BMC Plant Biol.* 2018. V. 18: 162.
78. Dubey M., Jaiswal V., Rawoof A., Kumar A., Nitin M., Chhapekar S.S., Kumar N., Ahmad I., Islam K., Brahma V., Ramchiary N. Identification of genes involved in fruit development/ripening in *Capsicum* and development of functional markers // *Genomics.* 2019. V. 111. P. 1913. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.01.002>
79. Fei Z., Tang X., Alba R.M., White J.A., Ronning C.M., Martin G.B., Tanksley S.D., Giovannoni J.J. Comprehensive EST analysis of tomato and comparative genomics of fruit ripening // *Plant J.* 2004. V. 40. P. 47.
80. Seymour G.B., Ryder C.D., Cevik V., Hammond J.P., Popovich A., King G.J., Vrebalov J., Giovannoni J.J., Manning K. A SEPALLATA gene is involved in the development and ripening of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) fruit, a non-climacteric tissue // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 1179. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq360>
81. Slugina M.A., Shchennikova A.V., Pishnaya O.N., Kochieva E.Z. Assessment of the fruit-ripening-related FUL2 gene diversity in morphophysiologicaly contrasted cultivated and wild tomato species // *Molecular Breeding.* 2018. V. 38: 82 <https://doi.org/10.1007/s11032-018-0842-x>
82. Slugina M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. The expression pattern of the Pho1a genes encoding plastidic starch phosphorylase correlates with the degradation of starch during fruit ripening in green-fruited and red-fruited tomato species // *Funct. Plant Biol.* 2019. V. 46. P. 1146. <https://doi.org/10.1071/FP18317>
83. Efremov G.I., Slugina M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Differential Regulation of Phytoene Synthase *PSY1* During Fruit Carotenogenesis in Cultivated and Wild Tomato Species (*Solanum* section *Lycopersicon*) // *Plants.* 2020. V. 9: 1169 <https://doi.org/10.3390/plants9091169>
84. Slugina M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. TAI vacuolar invertase orthologs: the interspecific variability in tomato plants (*Solanum* section *Lycopersicon*) // *Mol. Genet. Genomics.* 2017. V. 292. P. 1123. <https://doi.org/10.1007/s00438-017-1336-y>
85. Slugina M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. LIN7 Cell-Wall Invertase Orthologs in Cultivated and Wild Tomatoes (*Solanum* Section *Lycopersicon*) // *Plant Mol. Biol. Rep.* 2018. V. 36. P. 195. <https://doi.org/10.1007/s11105-018-1071-5>
86. Slugina M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Differences in the sucrose synthase gene *SUS1* expression pattern between *Solanum lycopersicum* and wild tomato species // *Theor. Exp. Plant Physiol.* 2019. V. 31. P. 455. <https://doi.org/10.1007/s40626-019-00158-6>
87. Giovannoni J., Nguyen C., Ampofo B., Zhong S., Fei Z. The epigenome and transcriptional dynamics of fruit ripening // *Ann. Rev. Plant Biol.* 2017. V. 68. P. 61.
88. Li Z., Jiang G., Liu X., Ding X., Zhang D., Wang X., Zhou Y., Yan H., Li T., Wu K., Jiang Y., Duan X. Histone demethylase SIJM6 promotes fruit ripening by removing H3K27 methylation of ripening-related genes in tomato // *New Phytol.* 2020. V. 227. P. 1138. <https://doi.org/10.1111/nph.16590>
89. Guo J.E., Hu Z., Yu X., Li A., Li F., Wang Y., Tian S., Chen G. A histone deacetylase gene, *SIHDA3*, acts as a negative regulator of fruit ripening and carotenoid accumulation // *Plant Cell Rep.* 2018. V. 37. P. 125. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2211-3>
90. Liu R., How-Kit A., Stammitti L., Teyssier E., Rolin D., Mortain-Bertrand A., Halle S., Liu M., Kong J., Wu C. A DEMETER-like DNA demethylase governs tomato fruit ripening // *PNAS.* 2015. V. 112. P. 10804.
91. Lang Z., Wang Y., Tang K., Tang D., Datsenka T., Cheng J., Zhang Y., Handa A.K., Zhu J.-K. Critical roles of DNA demethylation in the activation of ripening-induced genes and inhibition of ripening-repressed genes in tomato fruit // *PNAS.* 2017. V. 114. P. 4511.
92. Cheng J., Niu Q., Zhang B., Chen K., Yang R., Zhu J.K., Zhang Y., Lang Z. Downregulation of *RdDM* during strawberry fruit ripening // *Genome Biol.* 2018. V. 19: 212. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1587-x>
93. Huang H., Liu R., Niu Q., Tang K., Zhang B., Zhang H., Chen K., Zhu J.K., Lang Z. Global increase in DNA methylation during orange fruit development and ripening // *PNAS.* 2019. V. 116. P. 1430. <https://doi.org/10.1073/pnas.1815441116>
94. Yu W., Peng F., Xiao Y., Wang G., Luo J. Overexpression of *PpSnRK1* in Tomato Promotes Fruit Ripening by Enhancing RIPENING INHIBITOR Regulation Pathway // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9: 1856. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01856>
95. Li G.J., Peng F.T., Zhang L., Shi X.Z., Wang Z.Y. Cloning and characterization of a *SnRK1*-encoding gene from *Malus hupehensis* Rehd. and heterologous expression in tomato // *Mol. Biol. Rep.* 2010. V. 37. P. 947. <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9734-9>
96. Wang X.L., Peng F.T., Li M.J., Yang L., Li G.J. Expression of a heterologous *SnRK1* in tomato increases carbon assimilation, nitrogen uptake and modifies fruit development // *J. Plant Physiol.* 2012. V. 169. P. 1173. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.04.013>
97. Naing A.H., Kyu S.Y., Pe P.P.W., Park K.I., Lee J.M., Lim K.B., Kim C.K. Silencing of the phytoene desaturase (*PDS*) gene affects the expression of fruit-ripening genes in tomatoes // *Plant Methods.* 2019. V. 15: 110. <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0491-z>
98. Sun Q., Zhang N., Wang J., Cao Y., Li X., Zhang H., Zhang L., Tan D.X., Guo Y.D. A label-free differential proteomics analysis reveals the effect of melatonin on promoting fruit ripening and anthocyanin accumulation upon postharvest in tomato // *J. Pineal Res.* 2016. V. 61. P. 138. <https://doi.org/10.1111/jpi.12315>

## ИЗМЕНЕНИЕ ПРОТЕОМА И ЛИПИДОМА МЕМБРАН РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ В ХОДЕ РАЗВИТИЯ

© 2021 г. М. Ф. Шишова<sup>а</sup>, \*, В. В. Емельянов<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Санкт-Петербургский государственный университет”, Санкт-Петербург, Россия

\*e-mail: mshishova@mail.ru

Поступила в редакцию 28.08.2020 г.

После доработки 25.02.2021 г.

Принята к публикации 28.02.2021 г.

Бурное развитие системной биологии включает в себя усиление таких направлений, как протеомика и липидомика. Они нашли свое развитие в системной биологии растений. Можно отметить возрастающее число работ, посвященных анализу протеомов и липидомов растительных клеток, тканей и целых органов. Достаточно подробно в литературе представлены сведения об особенностях протеома и липида растительных ядер, митохондрий и хлоропластов. Для большинства одномонобренных органоидов растительной клетки, таких как тонопласт, аппарат Гольджи, эндоплазматическая сеть и др., аналогичные исследования существенно ограничены. В обзоре рассматриваются существующие представления о специфичности белковых и липидных спектров мембранных структур растительной клетки, а также представлен анализ немногочисленных данных об их динамическом изменении в ходе развития и при действии стрессовых факторов.

**Ключевые слова:** протеом, липидом, масс-спектрометрия, рафты, плазмалемма

**DOI:** 10.31857/S001533032105016X

### ВВЕДЕНИЕ

Основополагающая функция мембран эукариотической клетки заключается в компарментализации биохимических и физиологических процессов. В каждом компартменте (органоиде) создаются уникальные условия, характеризующиеся уровнем pH, уникальным спектром макро- и микроэлементов, биологически активных соединений, разнообразными энергетическими ресурсами и др. Обусловлена эта функция особенностями строения биологических мембран. Согласно жидкостно-мозаичной модели, предложенной в 1972 г., мембрана представляет собой липидный бислой, образованный преимущественно фосфолипида-

ми, а также белками разной степени “погружения” в этот липидный матрикс [1, 2].

Многочисленные эмпирические данные свидетельствуют о разнообразии белков в различных мембранных структурах. Мембранные белки, в состав которых входят транспортеры, рецепторы, ферменты и др., участвуют в работе сигнальных и метаболических сетей клетки, тем самым, обеспечивая адаптацию растительных клеток к стрессовым воздействиям и реализацию этапов жизненного цикла. Достаточно долгое время не представлялось возможным охарактеризовать специфичность белковых спектров, свойственных той или иной мембране, не говоря о динамическом изменении белкового профиля при действии различных факторов. Современные технологические подходы позволяют решать такие проблемы с помощью системной биологии, составной частью которой является протеомика, а, вернее, сочетание геномики, транскриптомики и протеомики.

Термин “протеом” был предложен в 1995 г. для обозначения всех белков изучаемого объекта (клетки, ткани, организма и т.д.), кодируемых геномом и синтезируемых в определенных условиях [3]. Секвенирование генома арабидопсиса, а позднее и большого числа других видов растений, имело революционное значение в идентифика-

**Сокращения:** ГЛ – глицерогликолипиды; ГДГ – глюконозилдиацилглицерол; ГФЛ – глицерофосфолипиды; ДАГ – диацилглицерол; ДГДГ – дигалактозилдиацилглицерол; ДФГ – дифосфатидилглицерол; МГДГ – моногалактозилдиацилглицерол; ПМ – плазмалемма, плазматическая мембрана; СПУ – системная приобретённая устойчивость; СФЛ – сфинголипиды; СХДГ – сульфохинозилдиацилглицерол; ФГ – фосфатидилглицерол; ФИ – фосфатидилинозитол; ФК – фосфатидная кислота; ФС – фосфатидилсерин; ФХ – фосфатидилхолин; ФЭ – фосфатидилэтаноламин; ЭПС – эндоплазматическая сеть; ИМР – интегральные мембранные белки; РМР – периферические мембранные белки; GPI – мембранные белки, заякоренные гликозилфосфатидилинозитолом.

ции белков и аннотации их функций. Протеомный анализ, основанный на таких методах, как 2-D PAGE (двумерный гель-электрофорез в полиакриламиде), ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) и масс-спектрометрия, позволяет определить количество белков интереса в образце, идентифицировать их, выявить первичную структуру и посттрансляционные модификации [4, 5]. Оригинальное сравнение различных подходов к протеомному анализу представлено в статье Мошковского и Пташник [6]. Масштаб одного протеомного исследования в настоящее время может составлять несколько сотен и даже тысяч белков, требующих идентификации и определения их возможной функции.

В связи с бурным развитием протеомики накоплено много результатов, которые легли в основу широкого спектра баз данных, в том числе о первичных белковых последовательностях и их модификациях (фосфорилирование, гликирование и др.), а также о функциональном значении различных белков: протеинкиназ, транскрипционных факторов, различных ферментов, белков межбелкового взаимодействия и др. Недавно эти базы данных были достаточно подробно охарактеризованы Subba с соавт. [7]. Вслед за авторами, следует сделать вывод о необходимости их дальнейшего расширения. Например, ощущается необходимость создания и развития данных о протеоме сигнальных каскадов, сетей вторичного метаболизма, различных мембранных органоидов. В связи с тем, что по результатам ряда исследований из 27000 белков арабидопсиса предположительно 25–30% являются интегральными мембранными белками [8, 9], сравнительный анализ белковых профилей мембран растительных клеток представляет особый интерес.

Не уступает по своему значению и развитие такого направления, как липидомика растений. Сам термин “липидом” был предложен по аналогии с протеомом [10] и подразумевает всю совокупность липидов клетки, ткани, органа или организма. Как и большинство “омиковых” дисциплин, липидомика использует высокотехнологичные и максимально автоматизированные методы экстракции, разделения и анализа липидов, а также биоинформатическую обработку полученных данных. Чаще всего применяют варианты жидкостной хроматографии с последующей масс-спектрометрической детекцией с различными способами ионизации [11–14]. Липиды – это, как правило, невысокомолекулярные, гидрофобные или амфифильные молекулы, хорошо растворимые в неполярных растворителях и образованные в результате карбоанионной конденсации тиоэфиров (производные жирных кислот и поликетиды) и/или карбокатионной полимеризации изопрена (терпеноиды, включая стероиды) [11, 15]. Липидом эукариотической клетки насчитывает от нескольких

сотен до тысяч индивидуальных липидов, формирующих клеточные мембраны и накапливающихся в запасующих структурах [14]. Несмотря на большое разнообразие полученных данных, наши представления о закономерностях динамического изменения липидных профилей в ходе развития и действия стрессовых факторов все еще достаточно ограничены.

Рассмотрим современные представления о белковых и липидных спектрах мембран растительных клеток.

### РАЗВИТИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ О МНОГООБРАЗИИ ПРОТЕОМА И ЛИПИДОМА МЕМБРАННЫХ СТРУКТУР РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ. ИСТОРИЯ, ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ. ПРОТЕОМ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН

Начало исследований в области протеома растительных мембран связано с анализом белков ядер, хлоропластов и митохондрий. Выделение этих крупных двумембранных органоидов проводили с помощью низкоскоростного центрифугирования, и последующая идентификация их мембран не вызывала сомнения.

Протеом мембран митохондрий клеток арабидопсиса на сегодняшний день является одним из наиболее охарактеризованных. Еще в работе Vrugiere с соавт. [16] были приведены данные о белках митохондриальных мембран. Немногим позже использование различных способов экстракции и последующий LC-MS/MS анализ способствовало идентификации 114 белков, что на 40% увеличило спектр анализируемых белков. В число 80 функционально аннотированных белков митохондрий клеток арабидопсиса вошли белки, участвующие в мембранном транспорте, в том числе электронов, цикле ди- и трикарбоновых кислот, синтезе аминокислот и белков, защите от окислительного стресса и др. [17]. В настоящее время различные методы протеомного анализа позволяют увеличить белковые профили этих органоидов до 1000–1500 белков. Особого внимания заслуживают исследования различных устойчивых внутримембранных белковых комплексов [18]. К ним, безусловно, относятся комплексы дыхательной электрон-транспортной цепи, комплекс альтернативной оксидазы, АТФ-синтазный комплекс, а также целый ряд многокомпонентных транспортеров.

Первоначально в мембранах хлоропластов клеток арабидопсиса было выявлено 242 белка, из которых не менее 40% составляли интегральные мембранные белки. Функции 86 белков остались неизвестными [19]. Последующий прогресс методических подходов позволил детектировать 1200–1300 белков в хлоропластах того же модель-

ного растения, которые участвуют в реализации фотосинтеза, метаболизма серы и азота, синтеза аминокислот и жирных кислот, гормонов, вторичных метаболитов, пигментов, витаминов и др. Для некоторых из них удалось идентифицировать локализацию — строма, мембрана тилакоидов или люмен. Особого внимания заслуживают исследования крупных функциональных белковых комплексов в мембранах хлоропластов [20]. К их числу можно отнести светособирающие комплексы, белковые комплексы фотосистем, АТФ-синтазу, а также сложно организованные транспортные системы.

Не менее тернистый путь был пройден при изучении протеома ядер. Данные одной из первых работ, проанализировавшей ядра арабидопсиса, указывали на наличие 200 белков, специфичных для этого органоида [21]. Более масштабное исследование привело к идентификации уже 663 белков, функциональная аннотация которых вызвала определенные затруднения [22]. Установлено, что в число 345 ядерных белков входят белки транскрипционного аппарата, шапероны, белки сигнальных систем и др. Особо подчеркивается многообразие ядерных фосфорилированных белков. В последние годы, как и в случае хлоропластов и митохондрий, особое внимание уделяется протеомному анализу не только внешней и внутренней мембран ядра, но и идентификации трансмембранных белковых комплексов ядерной оболочки, включая ядерную пору [23, 24].

Отдавая должное явным успехам в изучении протеома мембран органоидов, окруженных сложной двумембранной структурой, следует отметить, что работа с другими внутриклеточными, так называемыми “легкими” мембранами, изначально характеризовалась значительными сложностями. Получение этих мембран основано на использовании высокоскоростного центрифугирования. Первоначально для разделения плазмалеммы, тонопласта, аппарата Гольджи, ЭПС использовали различные градиенты плотности, приготовленные с использованием сахарозы, сорбитола, перкола и др. [25]. Однако в большинстве случаев такое разделение не могло обеспечить полное отсутствие загрязнения мембранных фракций друг другом. Рассмотрение методических подходов не входит в задачу данного обзора, однако отметим следующее: специфичный метод очистки в настоящее время разработан, пожалуй, только для получения плазмалеммы [26]. Метод двухфазного разделения успешно применяется уже на протяжении более 30 лет. Он основан на использовании двух несмешивающихся растворов полиэтиленгликоля и декстрана, концентрация которых видо- и тканеспецифична. Некоторые подходы были предложены и для получения тонопласта [27–29], однако они не являются общепризнанными и все еще требуют дальнейшего совершен-

ствования. После получения очищенной или обогащенной той или иной мембранной фракцией пробы, исследователи сталкиваются с еще несколькими, не менее важными, проблемами. Они обобщены в работе Ephritikhine с соавт. [30]. Мембранные белки, в отличие от растворимых, плохо разделяются с помощью двумерного электрофореза в полиакриламидном геле (2D-PAGE) из-за физико-химической гетерогенности и значительной гидрофобности. Многие гидрофобные белки не растворяются в буфере для изоэлектрической фокусировки и выпадают в осадок в их изоэлектрической точке. Кроме того, белки большинства мембран отличаются низким содержанием, что зачастую не позволяет их анализировать стандартными методами протеомного анализа. Для преодоления перечисленных трудностей используют дополнительные методы экстракции гидрофобных белков и последующий анализ с помощью масс-спектрометрии.

Быстрое развитие технологических приемов анализа протеома мембран и наличие надежного подхода к выделению плазматической мембраны (ПМ) интенсифицировало изучение протеома именно этой мембраны. Интерес определило также значение плазмалеммы как основного барьера и важнейшего участника транспортной системы клетки. Кроме того, ПМ участвует в рецепции разнообразных химических и физических сигналов, а также в передаче этих сигналов внутрь клетки, тем самым запуская широкий спектр адаптационных и физиологических ответов на клеточном уровне.

В первых работах с применением масс-спектрометрии в составе плазмалеммы клеток арабидопсиса было идентифицировано около 100 белков, большая часть которых не была обнаружена в более ранних протеомных исследованиях [31]. Нанопоточная жидкостная хроматография, сопряженная с масс-спектрометрией (nano-LC/MS/MS), позволила выявить во фракции плазмалеммы клеток листьев *Arabidopsis thaliana* уже 238 белков [32]. Более 100 из них были отнесены к белкам, содержащим один и более трансмембранных доменов. Они были связаны со следующими функциями: транспорт через плазматическую мембрану и везикулярный транспорт внутри клетки, сигнальная трансдукция, ответные реакции на действие стрессоров. Наряду с этим небольшое число белков было ранее ассоциировано с другими клеточными компартментами, что может указывать на некоторое загрязнение фракции ПМ.

Исследования последних лет значительно расширили наши представления о различных группах белков плазмалеммы клеток арабидопсиса [33]. Из-за ограниченности объема данного обзора мы не будем подробно рассматривать все аннотированные белки, а остановимся на основных

группах. Белки ПМ принято подразделять на три основные категории в зависимости от типа мембранной ассоциации: интегральные мембранные белки (ИМР), периферические мембранные белки (РМР) и мембранные белки, заякоренные гликозилфосфатидилинозитолом (ГФИ). ИМР имеют один или несколько трансмембранных доменов. На N-конце присутствует сигнальная последовательность, обеспечивающая “доставку” белков в плазмалемму через ЭПС и аппарат Гольджи. К этой группе, в первую очередь, относятся системы пассивного и активного транспорта ионов. Наиболее многочисленными являются  $H^+$ -АТФаза и аквапорин [34], а также разнообразные транспортеры ионов, включая ионы тяжелых металлов, транспортеры органических молекул, в том числе гормонов, а также белки, выполняющие сигнальную функцию (например, рецептор-подобные киназы (RLK)). Периферические белки не имеют достаточного гидрофобного домена. Они взаимодействуют с плазмалеммой за счет нековалентных белок-белковых взаимодействий или ковалентных липидных модификаций в результате N-миристоилирования, S-пальмитирования или пренилирования. К этой группе относят белки, регулирующие везикулярный трафик, в том числе растительные Rho (ROPs) и SNARE белки (Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptors) [9, 35]. Третья группа – белки, взаимодействующие с плазмалеммой за счет гликозилфосфатидилинозитолом. Представляется, что данная модификация белков происходит в аппарате Гольджи. К этой группе, в основном, относятся ферменты, участвующие в формировании клеточной стенки, включая  $\beta$ -1,3-глюконазы, пектинэстеразы и полигалактуроназы [36]. Особого внимания заслуживают белки, входящие в состав микродоменов плазмалеммы. По липидному составу микродомены (рафты, детергент-устойчивые домены) обогащены сфинголипидами и стеринами, что создает более упорядоченные участки по сравнению с окружающим слоем, образованным преимущественно фосфолипидами [37]. Липидная составляющая рафтов будет рассмотрена ниже. Обратимся к белкам, входящим в эти домены. Ряд исследований позволил выявить маркерные для рафтов белки. К ним относят KAT1 ( $K^+$ -канал), PIP2;1 (аквапорин), PIN1, PIN2 и некоторые ABCB (транспортеры ауксина), реморины (группа белков иммунного ответа) и др. [38]. Следует отметить, что, несмотря на физико-химические свойства этих доменов, по своему составу рафты все же являются динамическими структурами, состав которых сильно зависит от условий и изменяется во времени. К сожалению, полностью представить соотношение различных по функциональной активности групп белков (транспортеров, ферментов, рецепторов и др.) плазмалеммы до

сих пор достаточно сложно, так как все еще велика доля неохарактеризованных белков.

Протеомные исследования проводятся и для других одномембранных органоидов. Первые характерные белковые профили для вакуолярной мембраны (тонопласта) были получены практически одновременно с таковыми для плазмалеммы, но авторы пришли к выводу, что загрязнение мембранных препаратов было значительным. Использование культуры клеток арабидопсиса и последующее получение протопластов позволило в значительной степени улучшить ситуацию [39]. Всего было выявлено 263 белка, из которых 46, предположительно, имели по два трансмембранных домена, остальные 177 имели один трансмембранный домен или не имели его. По базе данных были аннотированы 129 белков. В эту группу входили белки V- $H^+$ -АТФазы, пирофосфатазы, транспортеры  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ , сахарозы, аминокислот и др. Функции 21 белка были связаны с системами деградации других белков. К сожалению, 34 белка так и остались неохарактеризованными, а небольшое число белков было аннотировано ранее как компоненты других мембран. Более полная характеристика протеома тонопласта культуры клеток арабидопсиса была приведена в работе Jaquinod с соавт. [40]. Согласно проведенному анализу идентифицированные белки участвуют в транспорте ионов и метаболитов (26%), стрессовых реакциях (9%), передаче сигналов (7%) и метаболизме (6%), а также обеспечивают такие вакуолярные функции, как гидролиз белков и сахаров.

Первые данные о протеоме аппарата Гольджи были получены в 2000-х гг. [41]. Однако невозможность корректно изолировать мембраны этого органоида ставит полученные в указанный период результаты под некоторое сомнение. Тем не менее, интерес к аппарату Гольджи очень велик, особенно в связи с протекающими в этом органоиде синтетическими процессами, обеспечивающими строительство клеточной стенки растений. Относительно недавно был предложен новый подход: были применены последовательно очистка в градиенте плотности, а затем метод разделения на основе поверхностного заряда [42]. Это позволило получить мембранную фракцию достаточно высокой степени очистки. Последующий протеомный анализ позволил идентифицировать 491 белок. К ним отнесены 64 белка, загрязняющих фракции митохондриальных мембран (28 белков), ЭПС (15 белков) и цитоплазмы (14 белков), а также шесть белков, ранее идентифицированных как пластидные, ядерные и пероксисомные. Более 50 белков (56) функционально были отнесены к системе белкового синтеза. Из оставшихся 371 белка 20% отнесены к биосинтезу полисахаридов матрикса клеточной стенки, 12% – к транспортерам, 12% – к трансферазам, еще 12% были связа-

ны с секреторными процессами. Выявлена группа белков (55 белков, 12%), свойственных другим мембранам, но не являющихся показателем загрязнения мембран. К этой группе относятся, например, целлюлозосинтаза и V-АТФаза. Предположительно, это “транзитные” белки аппарата Гольджи.

К сожалению, исследований, посвященных протеомному анализу эндоплазматической сети, очень мало. Тем не менее, 182 белка относят к этому органеллу [41]. Тридцать из них остались неохарактеризованными. Остальные белки участвуют в фолдинге и модификации синтезируемых белков, а также вовлечены в ряд метаболических процессов. К белкам первой группы были отнесены два гомолога Sec63, пять гомологов пептидаз, шапероны BiP, HSP90, кальнексин, кальретикулин, девять протеин-дисульфид-изомераз и пептидил-пролил-изомеразы. Были идентифицированы белки комплекса олигосахарид-трансферазы (гомологи рибофорина I, рибофорин II, два гомолога STT3, OST3, OST6, OST48 и DAD1), которые отвечают за перенос олигосахарида в процессе N-связанного гликозилирования. В группу “метаболических” белков вошли 18 цитохромов P450, НАДФН-цитохром P450-редуктаза, НАДН-цитохром b5-редуктаза, два белка цитохрома b5 и 11 белков, участвующих в метаболизме липидов. Следует упомянуть еще одну группу белков, участвующих в ионном гомеостазе ЭПС, включая представителей семейства  $Ca^{2+}$ -АТФаз, а также белки, опосредующие обмен между ЭПС и аппаратом Гольджи (AtSEC12, COPII, гомолог RHD3 и др.).

Развитие технологий секвенирования позволило расширить протеомные исследования и на другие растения, в том числе на злаки (рис, кукуруза, овес и рожь) и двудольные растения (табак, соя и др.). Были проанализированы различные органы этих растений и полученные из них культуры клеток [43]. Очень интересны результаты работы, в которой проведен сравнительный анализ не только белковых профилей плазмалеммы овса и ржи, но и белкового состава нанодоменов. С использованием нано-LC-MS/MS-анализа было идентифицировано 219 белков у овса и 213 белков у ржи. При этом 56% в первом случае и 47% во втором составили белки, специфичные для нанодоменов овса и ржи, соответственно. Авторам удалось достаточно подробно охарактеризовать соотношение различных групп функционально значимых белков в составе плазмалеммы/нанодоменов разных представителей злаков [44].

Таким образом, увеличивается число исследований, характеризующих белковые спектры мембран растительных организмов, представляющих интерес с точки зрения агропроизводства и биотехнологии. Наряду с этим имеются данные и о белковых профилях мембран, на первый взгляд, экзотических растений. Например, были исследованы

белковые профили плазмалеммы и тонопласта клеток листьев *Avicennia officinalis*, произрастающих в экваториальных мангровых болотах Сингапура. Даже при условии несеквенированного генома было идентифицировано 254 белка плазматической мембраны и 165 белков тонопласта [45]. Несколько меньше белков удалось выявить в протеоме плазмалеммы *Menta arvensis* – 122 белка, из которых лишь 21 был идентифицирован [46].

Интересные данные о тканеспецифичности белковых спектров плазмалеммы получены на растениях тополя [47]. Относительно большая часть (42%) из 956 белков обнаружена в плазматических мембранах клеток всех трех протестированных тканей (паренхима листа, ксилема, камбий/флоэма) и только 10–11% были уникальными для конкретной ткани. Дальнейший анализ показал, что 213 интегральных мембранных белков можно разделить по функциям на “транспортеры”, “рецепторы”, “клеточная стенка и метаболизм углеводов”, “перенос через мембрану”, “другие”, “неизвестные” и “вероятные загрязнители”. Более 70% транспортеров самой большой группы интегральных белков были детектированы в плазмалемме клеток листа, 32% – в мембранах всех трех тканей и только 25% были обнаружены исключительно в плазматических мембранах клеток ксилемы и/или камбия/флоэмы. Удивительно, но плазматические мембраны, выделенные из камбия/флоэмы, имели самую высокую долю рецепторов. Более 70% белков, участвующих в формировании клеточной стенки и метаболизме углеводов, и все белки, участвующие в мембранном переносе, были идентифицированы в плазматических мембранах клеток ксилемы. Очень немногие белки были общими между плазмалеммой мезофилла и двумя другими тканями (2–4% от общего количества). При этом в плазматической мембране клеток ксилемы и камбия/флоэмы были идентифицированы белки, не обнаруженные в плазматических мембранах клеток листа (21% от общего количества).

Следует отметить еще одно исследование, в котором проведено сравнение протеомов корней, этиолированных и зеленых листьев, растущих листовых пластинок и цветков растений риса [48]. Наряду с 511 белками, встречающимися во всех пяти анализируемых органах, каждый из органов имел ряд специфичных белков: 270 – для корня; 132 – для этиолированного листа; 359 – для зеленого листа; 146 – для развивающегося листа и 149 – для цветка. Установлено, что плазмалемма корней значительно отличалась по белковому профилю от такового у листа, независимо от того, развивался ли он на свету или в темноте. Белковый состав плазмалеммы клеток развивающейся листовой пластинки был ближе к таковому у цветка, но не зеленого листа. Особый интерес вызвали данные о том, что ПМ корней обогащены белками-

транспортерами по сравнению с плазмалеммой клеток листа, а также то, что плазматическая мембрана цветка отличалась большей насыщенностью белков, сопряженных с сигнальной функцией клетки по сравнению с протеомом плазмалеммы клеток зеленого листа.

Таким образом, данные последнего десятилетия указывают на специфичность белковых профилей и между тканями одного растения, и между разными растениями, что на новом технологическом уровне указывает на функциональную значимость белков в составе клеточных мембран. Не вызывает сомнения, что интенсивное развитие секвенирования, а также технологических приемов выделения и детектирования мембранных белков, лягут в основу дальнейшего продолжения исследований в области протеома мембранных органоидов.

### ЛИПИДОМ РАСТИТЕЛЬНЫХ МЕМБРАН

Липидом мембран состоит преимущественно из полярных липидов. Их амфифильная природа позволяет им ассоциировать в двухслойную мембранную структуру, а также выполнять множество других функций. Именно полярные липиды составляют основу липидного бислоя. Массовое соотношение липидов к белкам в мембране растительной клетки близко к 1:1, однако, если учитывать не абсолютное содержание, а усредненные молекулярные массы липидов и белков, то это соотношение будет варьировать в диапазоне от 50 : 1 до 100 : 1 [49]. Большинство мембранных липидов представлено глицерофосфолипидами (ГФЛ), наиболее распространенными из которых являются фосфатидная кислота (ФК), фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭ), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилинозитол (ФИ), диацилглицерол (ДАГ) и соответствующие им лизоформы. Реже, особенно во внутренних мембранах клетки, встречаются фосфатидилглицерол (ФГ) и дифосфатидилглицерол, или кардиолипин (ДФГ). Последний служит маркерным липидом внутренних мембран митохондрий, где он стабилизирует белки электрон-транспортной цепи [50]. ФХ составляет около 50% мембранных фосфолипидов, а вместе с ФЭ их доля увеличивается до 70–80% [49]. Жирнокислотный состав ГФЛ включает С16–С24 кислоты как насыщенного, так и ненасыщенного ряда с преобладанием С16 и С18 кислот [51]. Отличительной особенностью липидома растений является практически полное отсутствие плазмалогенов – ГФЛ, у которых в первом положении глицерина вместо остатка жирной кислоты находится остаток спирта с длинной алифатической цепью, связанный простой эфирной связью. Плазмалогены широко распространены у животных, как среди беспозвоночных, так и позвоночных, включая и человека [14].

Ещё одной характерной чертой липидома растений является присутствие особой группы глицерогликолипидов (ГГЛ) – галактолипидов. Эти липиды образуют мембрану пластид и представлены моногалактозилдиацилглицеролом (МГДГ), ди-галактозилдиацилглицеролом (ДГДГ), сульфохинозидилдиацилглицеролом (сульфолипид, СХДГ) [52], а также глюконозилдиацилглицеролом (ГДГ) [53]. Помимо высших растений эти липиды обнаружены в разнообразных эукариотических водорослях и оксифотобактериях [14]. В жирнокислотном компоненте галактолипидов растений доминируют С16:0, С16:3 и С18:3 кислоты [54].

Сфинголипиды (СФЛ) – важнейшая группа полярных липидов, которые могут составлять до 10% от общего уровня липидов в растениях [51]. Эта группа липидов длительное время оставалась слабоизученной, что связано с трудностями экстракции и последующего анализа [11, 13, 55]. СФЛ являются производными длинноцепочечных алифатических сфингоидных оснований (аминоспиртов). Сфинголипиды растений отличаются значительным разнообразием сфингоидных оснований. Помимо сфингозина и сфинганина, наиболее характерных для животных, у растений обнаруживается фитосфингозин и другие производные, различающиеся по наличию, количеству и изомерии двойных связей, а также числу гидроксигрупп [49, 56]. Жирнокислотная компонента, прикрепляющаяся к сфингоидному основанию амидной связью, представлена С14–С26 кислотами, преимущественно длинноцепочечными, насыщенными и часто гидроксильными в  $\alpha$ -положении [49, 56]. Преобладает насыщенная  $\alpha$ -гидрокси-С24 ( $\alpha$ -гидрокси-лигноцериновая) кислота [56]. Помимо сфингоидных оснований к ключевым группам растительных СФЛ относятся церамиды, глюкозилцерамиды (глицосфинголипиды) и гликозилинозитолфосфоцерамиды (фосфосфинголипиды). В клетках листьев арабидопсиса на их долю приходится по 0,5, 2, 34 и 64% от общего содержания СФЛ, соответственно [51]. Сфингомиелин, главный сфинголипид животных, у растений не встречается.

Еще одна важнейшая группа мембранных липидов представлена стеринами, которые относятся к производным изопрена. Характерной особенностью мембран растений является многообразие фитостеринов – более 200 видов [57]. Так, из проростков кукурузы выделено более 60 индивидуальных стеринных и пентациклических тритерпенов [51]. Главными стеринами в липидомах высших растений являются  $\beta$ -ситостерин, кампестерин и стигмастерин. В клетках арабидопсиса накапливается до 64, 11 и 6% этих стеринных, соответственно [57]. Весьма любопытно, что растения могут синтезировать и холестерин, содержание которого может достигать 10–20% от общего уровня стеринных, особенно в мембранах клеток корней злаков

[57]. Чаще всего фитостерины находятся в мембранах в свободном виде, однако они могут быть гликозилированы глюкозой, маннозой, ксилозой или галактозой с образованием стерилгликозидов, которые, в свою очередь, могут быть ацилированы С16-С18 кислотами [49, 51, 57]. Эфиры стериннов с жирными кислотами также можно обнаружить в растениях, но они редко входят в состав мембран (как у цветной капусты), а обнаруживаются преимущественно в липидных каплях наряду с триацилглицеридами и другими неполярными липидами [49].

Липидный состав клеточных мембран зависит от типа клеток, возраста, стадии развития и действия факторов окружающей среды. Большое значение имеет видовая принадлежность, хотя даже у представителей одного вида возможны значительные количественные отличия [58]. Липидом мембран лучше всего изучен у плазматической мембраны и двумембранных органоидов. В фотосинтезирующих клетках растений около 70–80% мембранных липидов приходится на долю хлоропластов, при этом 80–90% полярных липидов содержатся во внутренней мембране, преимущественно в мембране тилакоидов [12, 58].

Мембраны пластидной оболочки не содержат хлорофилла, состоят из глицеролипидов (80%) и свободных стериннов (до 1%). В наружной мембране пластиды на долю ГФЛ приходится 35–50%, преобладает ФХ (30–35%, в основном, в наружном монослое) и ФГ (10%), ГГЛ содержится до 50–60% (ДГДГ – до 30%, МГДГ – до 17% и СХДГ 6%). Внутренняя мембрана пластидной оболочки состоит преимущественно из ГГЛ (85–90%, с преобладанием МГДГ, 50–55%). Содержание ГФЛ не превышает 15%, лидирует ФГ (до 10%) [52, 58]. Тилакоидная мембрана также образована в основном из ГГЛ и имеет асимметричное строение: внешний монослой обогащён МГДГ и ФГ, а ДГДГ и СХДГ локализованы преимущественно во внутреннем слое, обращённом в сторону грани [12, 58]. Следует уточнить, что МГДГ не способны самостоятельно образовывать бислои. Тем не менее, роль МГДГ трудно переоценить, т.к. соотношение МГДГ к ДГДГ определяет формирование бислоя, взаимодействие липидов с белками, а также межбелковые взаимодействия в тилакоидных мембранах. Примером последнего может служить энергетическое взаимодействие между светособирающим комплексом и ФС II. Еще одно значение МГДГ заключается во взаимодействии с пигментами виолоксантинового цикла, выполняющими защиту от фотоокисления [59]. ФЭ и ФС полностью отсутствуют в пластидах [58]. Галактолипиды пластид в условиях фосфорного голодания могут замещать фосфолипиды в других мембранах клетки и появляться в плазмалемме, тонопласте [51], ЭПС и мембранах митохондрий [54]. Главным замещающим ГГЛ является ДГДГ, который

в цитозольном монослое плазмалеммы может достигать до 1/3 всех липидов при дефиците фосфата, тогда как в наружном монослое фосфолипиды замещаются ацилированными стерилгликозидами [49, 60].

Более 80% липидов мембран митохондрий приходится на долю ГФЛ. Содержание свободных стериннов достигает 12%, а их гликозидов 1–2% [58]. Главными ГФЛ наружной мембраны митохондрии являются ФХ (до 60%), ФЭ (25–30%) и ФИ (15–25%). Внутренняя мембрана также содержит ФХ, ФЭ (по 40%) и ДФГ (10–15%) [58, 61]. ДФГ специфичен для внутренней мембраны митохондрии. Его доля в других внутриклеточных мембранах (внешние мембраны митохондрий и пластид, мембрана пероксисом, микросомальная фракция) не превышает 2–3%, а в тонопласте ДФГ не детектируется совсем [61, 62]. ФС также не обнаруживается в митохондриях у растений [58, 61]. В составе ГФЛ митохондриальных мембран преобладают остатки жирных кислот с длиной цепи С16:0, С18:2 и С18:3 [54]. Такое своеобразие липидного спектра в мембранах митохондрий может быть обусловлено тем, что митохондрии являются полуавтономными органоидами в отношении биосинтеза липидов. ГГЛ они получают от пластид, ДАГ и ГФЛ от ЭПС, и далее синтезируют собственные ФГ и ДФГ [54, 63]. Кроме того, митохондрии обладают собственным биосинтезом жирных кислот, который отличается от пластидного и начинается с малоната [54].

Теперь рассмотрим данные о липидоме одномерных органоидов. Наибольшим разнообразием липидов, принимающих участие в ее формировании, отличается мембрана ЭПС. В ее составе представлены ГФЛ (более 80%), среди которых доминируют ФХ (35–65%), ФЭ (10–25%) и ФИ (3–18%). Присутствуют стеринны (3–14% свободных и 1–4% связанных, стерилгликозидов и ацилстерилгликозидов), а также сфинголипиды (2–8%, главным образом, глюкозилцерамиды) [58, 64]. Характерной особенностью мембраны ЭПС является относительно большое содержание ФК (0.5–7%) и лизофосфолипидов (0.8–1.7%), что связано с биосинтетической и транспортной ролью этого органоида в обеспечении липидного обмена клетки [64]. Кроме того, ЭПС содержит до 0.5–4% липидов, характерных для мембран пластид (МГДГ, ДГДГ) и митохондрий (ДФГ) [58]. Такое многообразие, возможно, обусловлено ролью ЭПС в синтезе липидов.

Подробное рассмотрение биосинтеза липидов выходит за рамки настоящего обзора. Однако заметим, что синтез жирных кислот протекает в пластидах, где синтезируются С16-С18 кислоты. Далее они транспортируются в мембрану ЭПС или вступают в прокариотический путь непосредственно во внутренней мембране пластиды, где

синтезируются ГГЛ и ГФЛ пластид [54]. Мембраны ЭПС являются основным местом биогенеза липидов в растительной клетке: здесь осуществляется эукариотический путь биосинтеза ГФЛ, удлиняются жирные кислоты, синтезируются триацглицериды, стеринны, сфингоидные основания, керамиды и глюкозилкерамиды [54, 56, 58]. Инозитолфосфоцерамиды, гликозилинозитолфосфоцерамиды и сложные сфинголипиды с длинной олигосахаридной головой синтезируются в аппарате Гольджи [65].

Глиоксисомы – органоиды, специализированные для катаболизма липидов, поэтому их мембраны кроме ГФЛ (25–50%, преобладают ФХ, ФЭ, ФГ и ФИ) содержат большое количество свободных жирных кислот (до 30–40%) [58]. Считается, что сами глиоксисомы фосфолипиды не синтезируют, а получают их из ЭПС [12, 58].

Тонoplast, или вакуолярная мембрана, состоит из ГФЛ (40–60%), свободных стериннов (5–20%), связанных стериннов (10–25%) и гликофинголипидов (10–20%) [27, 58, 62]. ФХ (30–50%) и ФЭ (24–50%) доминируют среди ГФЛ. Третья по численности группа ГФЛ представлена ФИ (7–15%), которые чрезвычайно важны для биогенеза вакуолей [62]. В составе липидов тонoplastа преобладают остатки С16:0, С18:1 и С18:2 жирных кислот [27]. В вакуолярной мембране обнаружены липид-белковые микродомены (рафты), обогащенные сфинголипидами и стеринами [27]. Именно в этих рафтах преимущественно локализована  $H^+$ -АТФаза V-типа [66]. Также как и в других внутренних мембранах, в тонoplastе присутствуют пластидные ГГЛ (1–15%) [27, 58, 62].

Плазматическая мембрана также отличается разнообразием составляющих ее липидов. Неотъемлемой чертой ПМ растений является наибольшее содержание сфинголипидов и стериннов по сравнению с внутриклеточными мембранами, а также значительная вариабельность соотношения между ГФЛ и другими мембранными липидами в зависимости от типа клеток, органной и систематической принадлежности [49, 57]. ГФЛ составляют 30–50%, СФЛ – 5–40% и стеринны – 20–50% от общего пула мембранных липидов ПМ [49, 58]. Среди ГФЛ, как и в других мембранах, преобладают ФХ (25–45%), ФЭ (30–40%). Остальные ГФЛ представлены ФС (3–12%), ФГ (2–15%), ФИ (2–11%) и ФК (0–20%) [49, 58, 61]. ПМ содержит максимальное количество ФС среди мембран растительной клетки, особенно у лука-порей. Также в ПМ содержится минорная фракция производных ФИ, полифосфоинозитиды или фосфатидилинозитол-фосфаты, которые участвуют в трансдукции сигналов, будучи предшественниками инозитолфосфатов [51]. В плазмалемме детектируется небольшое содержание ГГЛ пластид (0–2%) [58]. ГФЛ ПМ клеток побега

преимущественно ацилированы С16:0, С18:2 и С18:3 кислотами, но также в них встречаются остатки моно-, ди- и триеновых жирных кислот с длиной цепи С20–С22 [49, 54]. В фосфолипидах ПМ клеток корней преобладают остатки С16:0 и С18:2 кислот [49], причем содержание насыщенных ацилов равно или вдвое меньше содержания ненасыщенных и в корнях, и в побегах. Весьма интересно, что ФИ, как и большинство других ГФЛ, этерифицирован преимущественно полиеновыми жирными кислотами (50–70%), а жирнокислотный состав полифосфоинозитидов отличается большей насыщенностью (10–20%) [67].

Сфинголипиды плазмалеммы представлены гликозилинозитолфосфоцерамидами (25–30% от общего уровня липидов ПМ) и глюкозилкерамидами (2–3%) [68]. Стеринны ПМ представлены в первую очередь свободными формами (70–80% от уровня стериннов). Из конъюгированных стериннов ацилстерилгликозиды преобладают в ПМ клеточного листа [49, 68]. Именно сфинголипиды и стеринны ПМ участвуют в формировании липид-белковых рафтов. Их содержание в рафтах достигает 70 и 20%, соответственно, тогда как доля глицеролипидов не превышает 10%, а их жирнокислотный компонент представлен преимущественно насыщенными радикалами [68]. Одна молекула сфинголипида взаимодействует с тремя молекулами стигмастерина, формируя стабильный комплекс, который используется для построения рафта [51].

Следует отметить еще одну особенность в организации ПМ – различия в составе внешнего и внутреннего слоев. Внешний слой обогащен ФХ, СФЛ и стеринами, а ФС, ФИ, включая полифосфоинозитиды, и ДГДГ встречаются в ПМ только во внутреннем слое [60, 68]. Асимметрия мембраны свойственна не только плазмалемме, но и аппарату Гольджи, а в ЭПС она не обнаружена. Причины возникновения такого неравенства пока не выяснены. Изучение этого процесса во многом осложнено высокой скоростью флип-флоп перемещения липидов в мембране [69]. Одна из особенностей цитоплазматического (внутреннего) слоя ПМ состоит в ее негативном заряде (см. [51]). Отрицательно заряженные фосфолипиды, в первую очередь полифосфоинозитиды, создают электрический градиент, который может направлять процессы эндоцитоза. Электростатические свойства приобретают сигнальную функцию, т.к. могут определять полярность расположения в плазмалемме целого ряда белков, например, регулятора полярного транспорта фитогормона ауксина (PINOID), белковых компонентов рецептора барассиностероидов и др. Наличие отрицательного заряда и градиент рН между слоями плазмалеммы могут играть роль и в формировании особо организованных доменов – рафтов. Рафты также устроены асимметрично. Наружный слой рафта обогащен стеринами и гликозилинозитолфосфо-

церамидами с длинными три- гептагликозидными головками, а внутренний содержит больше ГФЛ, включая основную массу полифосфоинозитидов ПМ [37, 68].

Интересные результаты получены при изучении липидома клеточной мембраны в области плазмалеммы [70]. ПМ плазмалеммы была обогащена стеринами и сфинголипидами с длинноцепочечными жирными кислотами, а ГФЛ из этой мембраны были ацилированы менее ненасыщенными, чем в остальной ПМ, жирнокислотными радикалами. Таким образом, состав клеточной мембраны плазмалеммы сходен по своему составу с липидным рафтом.

Показано, что липиды в мембранах могут существовать в различных фазовых состояниях, которые зависят от структуры самого липида и от окружения. Липидомные исследования, проведенные на эукариотических клетках животных свидетельствуют, что липид-липидные и липид-белковые взаимодействия играют огромную роль в определении функциональной активности мембран, определяют активность ассоциированных ферментов и транспортеров. Фазовое состояние липидов может определять латеральную гетерогенность мембранных слоев. Липид-липидное взаимодействие фосфолипидов и стеринами является основой образования рафтов, которые изначально были ассоциированы с котранспортом мембранных белков и сфинголипидов из транс-доменов аппарата Гольджи к плазмалемме [69]. Липидный состав рафтов определяется уже в аппарате Гольджи. Там же в этот липидный домен встраиваются соответствующие белки. Гидрофобные взаимодействия между липидами и соответствующими доменами белков рассматриваются в качестве главной “движущей” силы самоорганизации этих доменов. Данные последних исследований показывают, что конформационные изменения трансмембранных белков (структура трансмембранных доменов, длина и фолдинг цитоплазматических доменов) имеют значение для последующей организации рафта и его доставки к плазмалемме. Тем самым, в составе фосфолипидного матрикса формируются функциональные домены. Для изучения состава рафтов используют различные детергенты, поэтому рафты еще называют детергент-устойчивыми доменами. Размеры рафтов также в значительной степени варьируют (от микро- до нанометрового диапазона), что удалось показать с применением микроскопии высокой степени разрешения [69]. Достаточно долгое время считалось, что именно липиды являются рафтообразующим компонентом. Однако последние данные указывают, что роль белков, входящих в состав рафтов, не столь пассивна. Например, толщина липидного слоя может определяться длиной гидрофобного домена белка. Кроме того, увеличение числа трансмембранных белковых доменов приводит к увеличе-

нию сродства стерина к данному участку фосфолипидного бислоя. Показано, что существуют маркерные для рафтов белки. Примером таких белков являются реморины (REM) [71]. Они кодируются мультигенным семейством, состоящим из шести групп. Значение белков этой группы многообразно. Очевидно, что REM участвуют во взаимодействии фитогормонов, в развитии клубеньков, замедлении развития патогенной инфекции, формировании плазмалеммы и т.д. В контексте данного обзора нас будет интересовать группа одна REM, в составе которой имеется домен, получивший название REM-CA (REM C-terminal Anchor). Использование мутантов по этому белку позволило доказать его необходимость в организации рафтов (нанодоменов размером 100 нм) в составе плазмалеммы клеток листьев табака. Продемонстрировано, что REM-CA обеспечивает ассоциацию белка с внутренним слоем плазмалеммы. Показано изменение конформации REM-CA домена в присутствии стерина и фосфатидилинозитол-4-фосфатов (ФИФ). Предполагается, что наличие высоконасыщенных ацильных групп в составе последних (30–60%) обеспечивает преимущественное взаимодействие со стеринами, а, следовательно, рассматривается в качестве “движущей силы” образования нанодоменов во внутреннем слое плазмалеммы [71].

Представленные данные свидетельствуют о большом разнообразии липидов в составе мембран эукариотических растительных клеток, обеспечивающимся работой ферментов, в кодировании которых задействовано не менее 5% генома [72].

#### ДИНАМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПРОТЕОМНЫХ И ЛИПИДОМНЫХ ПРОФИЛЯХ

Приведенные выше данные однозначно свидетельствуют о широком разнообразии белкового и липидного состава мембран растительной клетки. Общеизвестным является заключение о том, что эти различия определяют структуру и, главное, функцию каждой из клеточных мембран. Ряд данных указывает на то, что мембраны клеток являются очень динамичными структурами. В связи с этим, особый интерес представляют анализ изменения белковых и липидных профилей мембранных органоидов при действии различных стрессовых факторов или в процессе развития. Остановимся на изменениях, происходящих в одномембранных органоидах, сведения о которых немногочисленны и не систематизированы.

## ИЗМЕНЕНИЕ ПРОТЕОМОВ МЕМБРАН ПРИ ДЕЙСТВИИ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ И В ХОДЕ РАЗВИТИЯ

Рассмотрим исследования последних лет, в которых убедительно показаны изменения, детектируемые в белковых профилях при действии таких абиотических стрессовых факторов, как повышение концентрации солей, в том числе тяжелых металлов, снижение интенсивности водного режима, повышение и понижение температуры и др. Сдвиги в составе протеома мембран были установлены и при взаимодействии высших растений с симбиотическими и патогенными микроорганизмами. Чаще всего данные исследования были сфокусированы на анализе ПМ растительных клеток.

Эффект засоления на растения риса приводил к появлению в составе плазмалеммы 8 [73] или 18 белков [74], что свидетельствует о протекании стресс-индуцируемых изменений. В более позднем исследовании, проведенном на ПМ клеток корней овса двух сортов, различающихся по устойчивости к засолению, было показано, что в белковых профилях плазмалеммы было идентифицировано 479 белков [75]. Для 438 из них было предсказано наличие одного или более трансмембранных доменов. Предположительно эти белки могли участвовать в выполнении следующих функций: первичный и вторичный метаболизм, энергетический обмен, трансмембранный и везикулярный транспорт, структурные, защитные, сигнальные и др. Последующий анализ позволил выявить, что содержание 182 белков значительно изменилось, и, на основании характера этих изменений, было выделено пять кластеров. Наибольший интерес вызвал пятый кластер, насчитывающий 24 белка, отличавшихся наиболее сильным стресс-индуцируемым накоплением у более устойчивого к засолению сорта. Функционально эти белки могут выполнять метаболическую, энергетическую, запасающую и транспортную функции. Трем белкам этой группы, отвечающим за связывание стероидов или синтез фосфолипидов, было уделено особое внимание. Авторы доказали участие этих белков в регуляции развития корня и повышении устойчивости при действии засоления.

Ряд изменений в белковом профиле ПМ был отмечен при действии пониженных температур (см. обзор [76]). В экспериментах с растениями арабидопсиса было выявлено 38 белков, включая белки “раннего” ответа на дегидрирование (ERD10 и ERD14) и растительный синаптоагмин 1 (SYT1), предположительно участвующий в репарации мембраны после холодового повреждения. Определенные изменения, вызванные понижением температуры, были показаны и в составе микродоменов плазмалеммы. Эти изменения затрагивали Р-тип АТФаз, аквапорины, тубулины и белки, связан-

ные с клатрин-зависимым эндоцитозом. Последнее может свидетельствовать об активных “заменах” в составе плазмалеммы.

Особого внимания заслуживает исследование динамических изменений, происходящих в белковых профилях ПМ клеток листьев арабидопсиса, вызванных не только краткосрочным замораживанием ( $-2^{\circ}\text{C}$ ) после различной по длительности акклимации, но и последующим возвращением к исходным температурным условиям ( $23^{\circ}\text{C}$  – деакклимация) [77]. Обработка низкими температурами приводила к накоплению 90 белков и уменьшению 200 белков в составе плазмалеммы. Последнее соответствует общему снижению ростовой и метаболической активности клеток при понижении температуры. В числе стресс-индуцированных белков выделяли три функционально значимые группы: транспортеры, белки метаболизма и белки, связанные с поддержанием структуры. Остальные были отнесены к четвертой неидентифицированной группе. Следует заметить, что максимальные изменения белковых профилей достигались за разные временные интервалы от начала акклимации, что свидетельствовало о сложных путях достижения адаптации к холодному стрессу. Было показано, что абсолютное большинство динамически изменяющихся белков возвращалось к исходному уровню в ходе деакклимации.

Еще один повреждающий фактор – это затопление, приводящее к изменению газового состава среды, а главное – к снижению доступности кислорода для корневой системы. На проростках сои анализ протеомов субклеточных мембран выявил белки, число которых меняется при недостатке кислорода [78]. Отмечая важность плазматической мембраны в адаптации растений к недостатку кислорода, ее участия в регуляции цитоплазматического pH и уровня  $\text{Ca}^{2+}$ , а также тесную связь с процессами, происходящими в клеточной стенке, проведенное исследование выявило роль изменения таких белков, как аквапорины, белки теплового шока 70, ряд белков ионного гомеостаза и сигнальных систем. Авторы привели пример изменений, происходивших с протестированными 117 или 212 белками (в зависимости от способа выделения) мембран эндоплазматической сети. Было высказано предположение о том, что затопление преимущественно регулирует синтез и гликозилирование белков ЭПС клеток корней сои. Однако эти данные, по-видимому, требуют дальнейшего анализа [78].

Наряду с абиотическими факторами на белковый профиль клеточных мембран могут оказывать влияние и биотические воздействия. Например, при развитии заражения, вызванного фитопатогенным грибом *Alternaria alternata*, в протеоме плазмалеммы мяты наблюдались изменения в со-

держании 21 белка. Они были подразделены на функциональные группы: белки, участвующие в защитных реакциях, ассоциированные с углеводным и энергетическим обменом, а также обеспечивающие транспортные процессы [46].

Пожалуй, самое масштабное исследование динамических изменений, лежащих в основе фитоиммунитета, было проведено на плазмалемме клеток арабидопсиса [79]. Всего было идентифицировано 2300 белков. Проведенный анализ показал, что 20% белков, аккумулялирующихся при активации рецептора RPS2 растительно-бактериального взаимодействия, включали в себя белки плазмалеммы, участвующие в кальциевом и липидном сигналинге, мембранном транспорте, первичном и вторичном метаболизме, везикулярном транспорте, редокс-гомеостазе, фосфорилировании и др. [79].

Не менее значимые изменения выявлены и при взаимодействии люцерны усеченной и грибом арбускулярной микоризы. Недавно было проведено первое крупное сравнение белковых профилей плазмалеммы клеток корней микоризованных и немикоризованных растений [80]. В ходе микоризации выявлено динамическое изменение содержания 82 белков. Треть этих белков была ассоциирована с детергент-устойчивыми микродоменами плазмалеммы. Функционально ряд этих белков связан с углеводным и липидным обменом, а также участвует в реализации обменных процессов между растением-хозяином и симбиотическим микоризным грибом.

Хорошо известно, что бобовые растения вступают в тесные симбиотические отношения с азотофиксирующими бактериями. Анализ изменений в белковых профилях плазмалеммы были проведены на модельном растении — *Lotus japonicus* [81]. Анализ перибактероидной мембраны показал наличие 94 идентифицированных белков. К их числу относится большая группа транспортеров сахаров, пептидов, серы и др., аквапорины, несколько рецептор-подобных киназ, ряд белков, участвующих в защитных реакциях и др. Полученные данные свидетельствуют об изменении/усилении обменных и сигнальных процессов при формировании азотофиксирующего симбиоза, что отражается в динамических изменениях белковых профилей перибактероидной мембраны.

Рассмотрим теперь, что известно об изменении протеома мембран в ходе развития. К сожалению, исследования в этой области очень малочисленны. Неотъемлемым этапом жизненного цикла большинства растительных клеток является уникальный процесс роста растяжением. Его можно рассматривать как этап дифференциации клеток, в ходе которого длина клетки увеличивается многократно. У высших растений длина клеток колеблется в среднем между 10 и 100 мкм, однако

может достигать и нескольких сантиметров. Одним из классических модельных объектов изучения роста растяжением являются колеоптилы злаковых. В связи с этим большой интерес представляет собой сравнительное исследование микросомального и цитоплазматического протеомов клеток колеоптилей ржи [82]. Работа проведена на третьи сутки развития, когда колеоптилы интенсивно росли, и на четвертые сутки, когда колеоптиль прорывался настоящим листом и его рост резко (на 70%) останавливался. Белки разделяли методом двумерного дифференциального гель электрофореза (2-D DIGE) с последующей идентификацией состава изменяющихся пятен с помощью обращенно-фазовой жидкостной хроматографии, сопряженной с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS). Число белков микросомальной фракции резко снижалось при утрате способности к росту. Отсутствие соответствующей базы данных для белков растений ржи позволило идентифицировать только восемь динамически изменяющихся белков, в число которых вошла E субъединица вакуолярной H<sup>+</sup>-АТФазы.

Еще один модельный орган для изучения ростовых процессов — корень. Хорошо известно, что в корнях можно выявить несколько зон, отличающихся по своим функциям и способности к росту. Зона растяжения первичных корней проростков кукурузы послужила моделью для исследований протеома клеточной стенки [83, 84] и микросомальной фракции, обогащенной плазмалеммой [85] в процессе роста. Были использованы четыре зоны корней, включая зону интенсивного роста, примыкающую к меристеме [85]. Перед масс-спектрометрическим исследованием белки полученной фракции разделяли на SDS-PAGE с последующим ферментативным расщеплением их до пептидов в геле. Количественную оценку изменения белкового состава проводили по результатам масс-спектрометрии (LC-MS/MS). Для большей части проанализированных белков, 83% (574 белка), количественных различий между исследованными зонами выявлено не было. Для остальных белков было отмечено нелинейное изменение, которое могло включать в себя и полное отсутствие белка в той или иной исследованной зоне. В качестве примера белков, последовательно увеличивающих свое присутствие во фракциях с удалением от кончика корня, можно привести целлюлозосинтазу и аквапорины. Было установлено, что зона растяжения характеризовалась наибольшим числом “уникальных” белков, которые не встречались в других зонах корня. Число их достигало 36. К сожалению, идентифицировать белки, имеющие более сложную динамику, не представилось возможным в связи с отсутствием секвенированного генома кукурузы.

Рассмотрим результаты еще одного уникального исследования, проведенного на клетках суспензии

онной культуры арабидопсиса T87 [86]. Авторы впервые анализировали изменения протеома плазмалеммы клеток на разных стадиях развития (lag, log и стационарной фазах) суспензионной культуры и выявили различную динамику белковых профилей при действии стрессового фактора. Показано, что содержание 392 белков изменялось в плазмалемме клеток во время роста. Они были разделены на различные функциональные группы, что свидетельствует об изменениях физиологической активности ПМ в зависимости от фазы роста. Так, ряд аквапоринов (PIP2-1 и PIP2-5) накапливались при переходе от логарифмической к стационарной фазе. Сходная динамика была установлена для шести представителей РНТ1 – высокоспецифичных фосфатных транспортеров плазмалеммы. Разнонаправленными были тренды изменения состояния Р-типа  $H^+$ -АТФаз 1, 2, 3, 6 и 7, но не VHA-A в ходе развития суспензионной культуры. Отмечено, что из представителей ABC-переносчиков содержание пяти белков уменьшалось, а двух – увеличивалось во время log фазы роста. Авторы предположили, что паттерны изменения количества этих белков обусловлены тем, что активность везикулярной секреции (экзоцитоз и эндоцитоз) изменяется: усиливается в ходе логарифмической фазы, но снижается во время стационарной фазы. Наряду с выявлением динамики белков на разных этапах развития, авторы своей целью ставили анализ изменения протеомных профилей под воздействием холода и/или обработки АБК. Оказалось, что эффект обоих воздействий значительно отличался в зависимости от фазы роста. Количество холодо- и АБК-чувствительных белков уменьшалось во время логарифмической фазы роста. Полученные данные указывают на сложность регуляторных процессов, протекающих не только в клетке в целом, но и на уровне плазмалеммы.

Интенсивное увеличение длины клеток возможно и в результате апикального роста, примером которого может служить рост пыльцевой трубки. В экспериментах, проведенных на пыльце *Lilium longiflorum*, анализировали белковые профили микросомальной фракции, разделенной на пять субмембранных/органелльных фракций, в начале прорастания и через 10, 30, 60 и 240 мин дальнейшего роста пыльцы [87]. С помощью LC-MS/MS анализа было идентифицировано 270 белков. Показано увеличение белков, связанных с цитоскелетом, углеводным метаболизмом, энергетическим обменом и ионным транспортом на самых ранних этапах (10–30 мин). Наряду с этим уровень белков, относящихся к мембранному/белковому транспорту, сигнальной трансдукции, адаптивному ответу на стрессовое воздействие, существенно снижается. Показано, что белки, участвующие в синтезе аминокислот, липидов/стероидов, биосинтезе клеточной стенки, транспорте питательных веществ и др., были представлены в со-

ответствующих профилях независимо от этапа развития пыльцы. Тем самым, получены данные об изменении протеомов плазмалеммы и ряда других эндомембран в ходе прорастания пыльцевого зерна и формирования пыльцевой трубки.

Не вызывает сомнения, что плазмалемма клеток прорастающей пыльцы играет огромную роль в межклеточном взаимодействии пыльцы и пестика растений риса [88]. В ходе роста пыльцевой трубки интенсивно протекают обменные процессы на апикальном конце трубки. Проведенный протеомный анализ позволил выявить 1121 ассоциированный с ПМ белок. Для 192 белков отмечено изменение содержания: 119 его увеличивают, а 73 – уменьшают. Эти белки были отнесены к нескольким функциональным группам, в том числе, к сигнальным системам (в первую очередь, рецептор-подобным киназам) и транспортным системам, участвующим в обменных процессах между пыльцой и пестиком.

Еще один важнейший процесс, протекающий в растительных организмах, который можно рассматривать как этап развития – это созревание плодов. Значительные изменения в составе белков были отмечено для микросомальной фракции, полученной из клеток перикарпа плодов томата на 30 и 45 день от цветения, соответствующих полному формированию (зеленый) и созреванию (красный) плодов [89]. Всего с помощью нано-LC-MS/MS удалось выявить 1315 белков. В ходе созревания плодов томатов 145 из них характеризовались значительным изменением своего содержания. Функциональная аннотация этих белков позволила разделить их на несколько групп: метаболизм клеточной стенки, везикулярная секреция, вторичный метаболизм, липидный и белковый обмен, сигналинг, стресс-индуцированный ответ.

Исследование, проведенное на ягодах винограда, показало, что плазмалемма клеток подвергается существенным изменениям, отражающимся в белковых профилях, проанализированных с помощью 2D-электрофореза и MALDI-TOF-MS спектрометрии [90]. На первом этапе анализа очищенной фракции плазмалеммы было идентифицировано 119 белковых пятен. Последующий анализ выявил наличие 62 белков, предположительно содержащих 1–6 трансмембранных доменов. Идентифицированные белки были отнесены к восьми функциональным группам, обеспечивающим транспорт, метаболизм, сигналинг, синтез белка и др. Показано, что в ходе созревания происходит снижение числа белков в составе плазмалеммы: детектировано 119, 98 и 86 белков на 50, 75 и 95 день от начала цветения, соответственно. Статистически достоверное снижение было детектировано для 12 белков, к числу которых были отнесены Fe-связывающий белок, предшественник апоцитохрома *f*, предполагаемая ксилоглюкан-

эндо-трансгликозилаза, компонент шаперон-протеазного комплекса, зеатин О-гликозилтрансфераза, убиквитин-связывающий фермент E2-21 и другие, в том числе неидентифицированные. Было отмечено, что динамика уменьшения этих белков в составе плазмалеммы было неодинаковой.

Хорошо известно, что в формировании плодов огромное значение имеет вакуоль, которая может занимать до 90% объема клеток. Именно этот органоид “определяет” свойства плодов, т. к. в нем накапливаются такие метаболиты, как сахара, органические и аминокислоты и др. Накопление этих соединений обеспечивается различными транспортерами, ферментами, системами поддержания рН и др. Приведем пример изменения протеома тонопласта в процессе созревания яблок [91]. Количественный протеомный анализ (iTRAQ), сопряженный с нано-LC-MS/MS, позволил проанализировать 345 белков тонопласта. В эту группу входили различные транспортеры метаболитов и ионов, включая системы первично активного транспорта; белки, принимающие участие в сигналинге и метаболизме; белки, регулирующие везикулярную секрецию и адаптацию к действию стрессоров, причем 22 белка из них меняли свое содержание в ходе хранения плодов. Тем самым, получены очень важные данные о динамических изменениях протеома тонопласта не только в ходе развития и созревания плодов, но и в процессе их старения.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что как при действии стрессоров, так и при изменении характера роста или этапа развития наблюдаются изменения в белковом составе мембран, включая плазмалемму, тонопласт, мембраны ЭПС и аппарата Гольджи. Следует подчеркнуть, что динамические изменения мембранных профилей могут протекать очень быстро, включая минутные временные интервалы. Эти изменения могут определяться как увеличением содержания белков вследствие интенсификации синтетических процессов и/или везикулярной секреции, так и за счет их элиминации из состава мембран, механизмы которой еще очень мало изучены. Неоспорима необходимость продолжения исследований с использованием высокоочищенных мембранных препаратов, полученных из клеток растений с секвенированным геномом.

### ИЗМЕНЕНИЕ ЛИПИДОМА МЕМБРАН ПРИ ДЕЙСТВИИ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ И В ХОДЕ РАЗВИТИЯ

Не менее интересными являются данные о быстрых изменениях, которые происходят в составе липидов мембран растительных клеток. Технология липидомного анализа позволяет с высокой точностью оценить эти изменения. В настоящее время показаны изменения, происходящие в результате действия тех или иных стрессовых фак-

торов. Например, увеличение полиненасыщенности жирнокислотных остатков при действии низких температур с целью поддержания жидкостности мембран. Прежде чем подробно их рассмотреть, обратимся к данным о процессах, происходящих при нормальном развитии. На листьях арабидопсиса были показаны осцилляционные изменения в составе плазмалеммы (см. [92]). Пожалуй, это первый пример ритмичных изменений липидома мембран у растений. При световом режиме выращивания (12 ч свет/12 ч темнота) были показаны изменения в составе полярных глицеролипидов во фракции ФХ. Было высказано предположение, что липидный профиль отражает баланс между вновь синтезируемыми жирными кислотами и процессом восстановления ацильных групп жирных кислот за счет работы десатураз (FADs). Синтезируемые в хлоропластах жирные кислоты (C16 и C18) присоединяются к глицерину за счет ацилтрансферазной активности, после чего происходит процесс десатурации. Интересно, что ацетил-СоА карбоксилаза является светозависимым ферментом, в отличие от десатураз. Предполагают, что на свету процесс *de novo* синтеза жирных кислот протекает намного активнее, и это объясняет более высокий уровень насыщенности липидов мембран на свету. С наступлением темноты преобладающим становится процесс десатурации и уровень ненасыщенности возрастает. Суммируя, можно заключить, что липидом мембран – очень динамичная структура, свойства которой зависят от огромного числа факторов. Требуется продолжение исследований, чтобы окончательно определить факторы, которые могут управлять осцилляционными изменениями липидного профиля мембран.

История изучения устойчивости растительных организмов к низким температурам насчитывает более 180 лет [93]. Полученные данные позволяют заключить, что это свойство (устойчивость) контролируется целым рядом факторов, и в его установлении участвует множество метаболических путей и генетических механизмов. Неоднократно показано, что восприятие холодового сигнала, его трансдукция и формирование адаптивного ответа тесным образом связаны с липидами клеточных мембран. При действии этого стрессора мембранные липиды переходят из жидкостно-кристаллического состояния в гелевое, что приводит к повышению проницаемости мембраны и выходу электролитов. Увеличивается количество молекулярных форм липидов, в том числе за счет появления окисленных производных. Повреждение мембран в результате понижения температуры может протекать за счет перекидного окисления липидов, инициированного различными формами АФК. Накопление токсичного малонового диальдегида, синтезируемого в результате окисления мембранных липидов, гораздо более интенсивно

протекает в менее устойчивых растениях. Для снижения интенсивности этих негативных процессов наблюдается повышение ненасыщенности липидов клеточных мембран, в т.ч. плазмалеммы. Содержание С18:1, С18:2 и С18:3 быстро увеличивается, а С16:0 и С18:0 уменьшается. Важность этого процесса подчеркивается отсутствием устойчивости к холодовому стрессу у мутантов с нарушениями кодирования десатураз. Изменения могут затрагивать липидный спектр и других клеточных мембран. Показано увеличение содержания ФК и ДГДГ, но падение ФХ и МГДГ, что приводит к превращению ФХ в ФК в результате работы фосфолипазы D. ФК является предшественником синтеза галактолипидов, в т. ч., и в пластидных мембранах, а также важнейшей сигнальной молекулой, принимающей участие в передаче различных сигналов. Запускаемый ФК трансдукционный каскад далее кросс-интегрируется в  $Ca^{2+}$ -сигнальный каскад и сигналинг АБК [93]. Все перечисленное свидетельствует о важной роли мембранных липидов в регуляции адаптационных процессов при холодовом стрессе.

Следующий тип стрессора, на котором следует остановиться, — это повышение температуры. Типичная ответная реакция, выявленная у очень большого числа видов растений, заключается в снижении уровня ненасыщенности. Предполагают, что повышение температуры воспринимается  $Ca^{2+}$  каналами плазмалеммы, которые регулируются уровнем жидкостности мембран. Это запускает повышение уровня  $Ca^{2+}$ , связывание с кальмодулином и активацию семейства транскрипционных факторов, участвующих в регуляции уровня различных стрессовых белков, в том числе БТШ [94]. Следует отметить, что уровень ненасыщенности при термическом воздействии изменяется не только у липидов плазмалеммы, но и пластид, и ЭПС. Эти преобразования достигаются также в результате активности десатураз жирных кислот. Повышение нестабильности и увеличение времени обмена этих ферментов было отмечено при повышении температуры. Изменение уровня насыщенности липидов оказывает влияние на активность таких сигнальных ферментов, как фосфолипазы (в том числе Фл D и C) и протеинкиназы. В результате увеличивается концентрация ФК и/или инозитол-3-фосфата. Усложнение каскада обусловлено увеличением концентрации АФК (накопление  $H_2O_2$  в течение нескольких минут за счет активации НАДФН-оксидазы). Несколько иной сценарий событий развивается в хлоропластах и митохондриях. Повышение температуры запускает перекисное окисление. Увеличение АФК в этом случае инициирует ретроградный сигналинг, приводящий к стабилизации ФСII, а следовательно, регулирует интенсивность процесса фотосинтеза. Перечисленные процессы, запускаемые повышением

температуры, вызывают значительные изменения в составе мембран, однако это направление исследований еще продолжает развиваться.

Повышение температуры окружающей среды может в природных условиях происходить одновременно с действием еще одного стрессового фактора — засухи. Недостаток воды приводит к существенным морфологическим изменениям. Повышение ненасыщенности жирных кислот считается одной из самых ярких особенностей засухоустойчивых растений [95]. Воздействие этого стрессора у устойчивых растений приводит к накоплению полиненасыщенных жирных кислот (С18:2 и С18:3). Сравнительный анализ оводненных и стрессированных растений показал, что их липидный состав сильно различается. Уровень основных классов липидов, как и общее содержание липидов, снижается при дефиците воды. Так, концентрации ФЭ, ФС и ФК были снижены на 55%. Снижение некоторых форм МГДГ достигало 70%, в тоже время изменения уровня ДГДГ были минорны. В результате для более устойчивых растений отношение МГДГ/ДГДГ возрастало. Устойчивые к засухе растения характеризуются большим уровнем антиоксидантов, что препятствует интенсивному окислению жирных кислот и продукции оксипиринов. Отмечают снижение концентрации церамидов и повышение такового для стероидов. Представленные результаты свидетельствуют о существенных изменениях липидома растений при изменении водного режима их выращивания.

Ранее уже обсуждалась важная роль ГГЛ пластид в условиях фосфорного голодания, когда они замещают фосфолипиды в клеточных мембранах [51, 54, 60]. Особого внимания заслуживает пример, когда липидомный подход к изучению этого явления позволил открыть новый минорный глицерогликолипид — глюкуронозилдиацилглицерол (ГДГ) [53]. При дефиците фосфора уровень ГФЛ снижался в листьях арабидопсиса почти вдвое (особенно ФЭ, ФИ и ФГ), а ГГЛ — существенно возрастал (ДГДГ и ГДГ — в 2 раза, СХДГ — в 4.5 раза). В побеге риса содержание ГДГ увеличивалось в 5–7 раз. Синтез ГДГ в пластидах сопряжен с образованием СХДГ. Мутанты арабидопсиса по биосинтезу этих ГГЛ в большей степени повреждались фосфорным голоданием, чем растения дикого типа. При дефиците фосфора ГДГ аккумулировался также у томатов и сои [96]. Помимо высших растений, ГДГ обнаружен в водорослях.

Рассматривая возможные модификации липидома растительных мембран, следует остановиться на действии такого фактора, как засоление. В литературе имеются результаты ряда исследований о роли липидных изменений в адаптации к высоким концентрациям солей. Высокая соленость

(250 мМ NaCl) приводила к значительным изменениям в профилях ГФЛ, ГГЛ, СФЛ и стерин в корнях растений ячменя, выращенных гидропонно [97]. Плазматическая мембрана характеризовалась повышением уровня ненасыщенной С18:3 жирной кислоты в ГФЛ, кроме того в ответную реакцию были вовлечены преимущественно коротко- и среднецепочечные (С14-18) жирные кислоты по сравнению с длинноцепочечными. Пластидные мембраны повреждались более интенсивно, чем ПМ. Липидные профили мембран пластид характеризовались общим снижением уровня всех галактолипидов, включая ГДГ, увеличением МГДГ/ДГДГ и аккумуляцией ацилстерилгликозидов, что свидетельствовало о частичной деградации хлоропластных мембран. Повреждения были менее выраженными у солеустойчивых сортов. Деструктивных изменений в митохондриях обнаружено не было. Солевой стресс сопровождался накоплением ДФГ, что позволило предположить важную роль этого липида в поддержании стабильности митохондриальных мембран [97].

В процессе жизнедеятельности растения контактируют с огромным числом других организмов. В результате могут устанавливаться взаимоотношения самой разной направленности от патогенных до мутуалистических. Получены данные о функциональной роли разных групп липидов в ходе контактов с микроорганизмами [98]. Они участвуют в распознавании патогенов растением-хозяином (например, эргостерин) и передаче сигналов в клетках в месте инфекции (свободные жирные кислоты, оксипирины, глицерол-3-фосфат, церамиды и сфингоидные основания). Кроме того, некоторые липиды (азелаиновая кислота) опосредуют передачу сигнала инфекции дистальным органам растения во время СПУ. Липиды важны при заражении микроорганизмами грибами (лизофосфолипиды,  $\omega$ -гидроксизирные кислоты). Кроме того, для создания арбускулярных структур клетки-хозяина и арбускулярного гриба необходим интенсивный синтез мембранных липидов, чтобы обеспечить большую площадь поверхности для обмена метаболитов во время колонизации.

В заключение остановимся на немногочисленных пока примерах, как меняется липидом, особенно липидом мембран, в ходе ростовых процессов растительных клеток. Один из них – апикальный рост пыльцевой трубки. Она формируется при прорастании пыльцы и растет по тканям рыльца. При этом многократно увеличивается размер плазмалеммы и тонопласта. [99]. Огромное значение приобретает везикулярная секреция. Сравнительный анализ липидома прорастающей пыльцы и пыльцевого зерна позволил заключить, что в пыльце протекает комплексное изменение синтеза липидов и целый ряд классов липидов (структурных и сигнальных) синтезируется *de novo*. Причем у ряда растений состав ГФЛ в мембранах растущей

пыльцевой трубки сходен с таковым в листьях, а в прорастающей пыльце арабидопсиса ФИ и ФК составляют около 50% ГФЛ. Активно синтезируется экстрапластидный ДГДГ. Наиболее важными для формирования и прорастания пыльцы являются стерины и СФЛ. Мутанты по их биосинтезу часто стерильны. Уровень СФЛ в ПМ зрелой пыльцы выше, чем в вегетативных тканях, преобладают глюкозилцерамиды. Также существенно отличается стериновый состав мембран пыльцы. Если главным стерин в вегетативных тканях растений является ситостерин (60–75%), то в мембранах мужского гаметофита преобладает 24-метилхлестерин (45.5%), а стериновый состав пыльцы более разнообразен [99]. Однако требуется продолжение исследований для формирования комплексного представления о липидоме прорастающей пыльцы и окружающих тканей пестика.

Усиление синтеза липидов происходит и при другом типе роста – росте растяжением, который наблюдается при многократном быстром увеличении волокон хлопка. Экспериментальные данные предполагают, что биосинтез ненасыщенных ЖК, ФИ и фосфатидилинозитолмонофосфатов (ФИФ) активируется на раннем этапе развития волокон [100]. Выявлено преобладание ненасыщенных ФИ и их фосфатов, которые могут играть свою функциональную роль в регуляции и стимуляции удлинения клеточных волокон.

Приведенные данные свидетельствуют о существенных различиях в изменении липидных профилей различных мембран. Эти изменения могут иметь как быстрый сигнальный характер, так и происходить в рамках адаптационных процессов, а также характеризовать процессы роста.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог обзору данных о современном состоянии в области изучения протеома и липидома мембран растительных клеток, следует отметить интенсификацию этих исследований, которая опирается на многообразие и постоянное совершенствование новых методов разделения и детекции, базирующихся на хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией. Данный метод не может предоставить возможность точного количественного анализа изменения содержания белков или липидов в той или иной мембране. Однако, как и большинство омиковых подходов, он позволяет провести сравнительный качественный и полуквантитативный анализ. Огромную роль играет и расширение биоинформационных ресурсов, позволяющих оценить изменения, происходящие в совокупной белковой и липидной фракциях. Все это послужило углублению наших представлений о динамической модификации белковых и липидных профилей мембран в норме и при действии стрессовых факторов. Однако немногочисленные

данные все ещё не могут охарактеризовать все процессы, сопровождающие рост и развитие.

Резкое увеличение числа исследований в области протеома и липидома мембран свидетельствует о глубоком интересе к этой области системной биологии. Однако следует подчеркнуть, что биологические мембраны представляют собой не простое биохимическое соотношение белков и липидов в правильной пропорции. Мы только начинаем понимать всю сложность взаимовлияния между различными компонентами, которые определяют как физико-химические свойства биологических мембран, так и их функциональную активность. Недаром как белки, так и липиды мембран являются активными участниками разнообразных сигнальных систем. Приведенные в обзоре данные свидетельствуют о том, что интегральная сеть мембран растительной клетки выполняет не только функцию “разграничителя” (барьера) между протекающими процессами, но и активного их участника и регулятора. Однако очевидно, что потребуются большое число исследований, чтобы восполнить существующие пробелы.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-14-50413.

Авторы благодарят Рудашевскую Е.Л. за ценные советы при обсуждении материалов обзора.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Singer S.J., Nicolson G.L.* The fluidmosaic model of the structure of cell membranes // *Science*. 1972. V. 175. P. 720. <https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720>
2. *Nicolson G.L.* The fluid-mosaic model of membrane structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years // *BBA-Biomembranes*. 2014. V. 1838. P. 1451. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.10.019>
3. *Wilkins M.R., Pasquali C., Appel R.D., Ou K., Golaz O., Sanchez J.-C., Yan J.X., Gooley A.A., Hughes G., Humphery-Smith I., Williams K.L., Hochstrasser D.F.* From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis // *Nat. Biotechnol.* 1996. V. 14. P. 61. <https://doi.org/10.1038/nbt0196-61>
4. *Newton R.P., Brenton A.G., Smith C.J., Dudley E.* Plant proteome analysis by mass spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments // *Phytochemistry*. 2004. V. 65. P. 1449. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.04.015>
5. *Демидов Е.А., Пельтек С.Е.* Протеомика // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014. Т. 18. С. 166.
6. *Мошковский С., Пташник О.* 12 методов в картинках: протеомика. <https://biomolecula.ru/articles/12-metodov-v-kartinkakh-proteomika>
7. *Subba P., Kotimoole C.N., Prasad T.S.K.* Plant proteome databases and bioinformatic tools: an expert review and comparative insights // *OMICS*. 2019. V. 23. P. 190. <https://doi.org/10.1089/omi.2019.0024>
8. *Schwacke R., Schneider A., van der Graaff E., Fischer K., Catoni E., Desimone M., Frommer W.B., Flugge U.-I., Kunze R.* ARAMEMNON, a novel database for Arabidopsis integral membrane proteins // *Plant Physiol.* 2003. V. 131. P. 16. <https://doi.org/10.1104/pp.011577>
9. *Tan S., Tan H.T., Chung M.C.M.* Membrane proteins and membrane proteomics // *Proteomics*. 2008. V. 8. P. 3924. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800597>
10. *Kishimoto K., Urade R., Ogawa T., Moriyama T.* Non-destructive quantification of neutral lipids by thin-layer chromatography and laser-fluorescent scanning: suitable methods for “lipidome” analysis // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001. V. 281. P. 657. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4404>
11. *Акмурзина В.А., Селищева А.А., Швец В.И.* От анализа липидов к липидомике // *Вестник МИТХТ*. 2012. Т. 7. С. 3.
12. *Namasivayam E., Kowsalya R., Padarathi P.K., Manigandan K., Jayaraj R.L., Johnravindar D., Jagatheesh K.* Plant lipidomics: signalling and analytical strategies // *PlantOmics: The Omics of Plant Science* / Eds. Barh D., Khan M.S., Davies E. Springer India, 2015. P. 331–356. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2172-2\\_11](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2172-2_11)
13. *Shulaev V., Chapman K.D.* Plant lipidomics at the crossroads: from technology to biology driven science // *BBA-Mol. Cell Biol. L.* 2017. V. 1862. P. 786. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.02.011>
14. *Řezanka T., Kolouchová I., Gharwalová L., Palyzová A., Sigler K.* Lipidomic analysis: From archaea to mammals // *Lipids*. 2018. V. 53. P. 5. <https://doi.org/10.1002/lipd.12001>
15. *Fahy E., Subramaniam S., Brown H.A., Glass C.K., Merrill A.H. Jr., Murphy R.C., Raetz C.R.H., Russell D.W., Seyama Y., Shaw W., Shimizu T., Spener F., van Meer G., van Nieuwenhze M.S., White S.H. et al.* A comprehensive classification system for lipids // *J. Lipid Res.* 2005. V. 46. P. 839. <https://doi.org/10.1194/jlr.E400004-JLR200>
16. *Brugiere S., Kowalski S., Ferro M., Seigneurin-Berny D., Miras S., Salvi D., Ravanel S., d'Hérin P., Garin J., Bourguignon J., Joyard J., Rolland N.* The hydrophobic proteome of mitochondrial membranes from Arabidopsis cell suspensions // *Phytochemistry*. 2004. V. 65. P. 1693. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.03.028>
17. *Millar A.H., Heazlewood J.L., Kristensen B.K., Braun H.-P., Møller I.M.* The plant mitochondrial

- proteome // Trends Plant Sci. 2005. V. 10. P. 36.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.12.002>
18. Senkler J., Senkler M., Eubel H., Hildebrandt T., Lengwenus C., Schertl P., Schwarzlander M., Wagner S., Wittig I., Braun H.-P. The mitochondrial complexome of *Arabidopsis thaliana* // Plant J. 2017. V. 89. P. 1079.  
<https://doi.org/10.1111/tpj.13448>
  19. Peltier J.B., Friso G., Kalume D.E., Roepstorff P., Nilsson F., Adamska I., van Wijk K.J. Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of lumenal and peripheral thylakoid proteins // Plant Cell. 2000. V. 12. P. 319.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.12.3.319>
  20. Behrens C., Blume C., Senkler M., Eubel H., Peterhänsel C., Braun H.-P. The 'protein complex proteome' of chloroplasts in *Arabidopsis thaliana* // J. Proteomics. 2012. V. 91. P. 73.  
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.07.001>
  21. Pendle A.F., Clark G.P., Boon R., Lewandowska D., Lam Y.W., Andersen J., Mann M., Lamond A.I., Brown J.W.S., Shaw P.J. Proteomic analysis of the Arabidopsis nucleolus suggests novel nucleolar functions // Mol. Biol. Cell. 2005. V. 16. P. 260.  
<https://doi.org/10.1091/mbc.e04-09-0791>
  22. Giavalisco P., Nordhoff E., Kreitler T., Kloppel K.D., Lehrach H., Klose J., Gobom J. Proteome analysis of *Arabidopsis thaliana* by two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionisation-time-of flight mass spectrometry // Proteomics. 2005. V. 5. P. 1902.  
<https://doi.org/10.1002/pmic.200401062>
  23. Tang Y., Huang A., Gu Y. Global profiling of plant nuclear membrane proteome in Arabidopsis // Nat. Plants. 2020. V. 6. P. 838.  
<https://doi.org/10.1038/s41477-020-0700-9>
  24. Goto C., Hashizume S., Fukao Y., Hara-Nishimura I., Tamura K. Comprehensive nuclear proteome of Arabidopsis obtained by sequential extraction // Nucleus. 2019. V. 10. P. 81.  
<https://doi.org/10.1080/19491034.2019.1603093>
  25. Collins C.A., Leslie M.E., Peck S.C., Heese A. Simplified enrichment of plasma membrane proteins from Arabidopsis thaliana seedlings using differential centrifugation and Brij-58 treatment // Methods Mol. Biol. 2017. V. 1564. P. 139.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6813-8\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6813-8_13)
  26. Larsson C., Widell S., Kjellbom P. Preparation of high-purity plasma membranes // Methods Enzymol. 1987. V. 148. P. 558.  
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48054-3](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48054-3)
  27. Ozolina N.V., Nesterkina I.S., Kolesnikova E.V., Salyaev R.K., Nurminsky V.N., Rakevich A.L., Martynovich E.F., Chernyshov M.Yu. Tonoplast of *Beta vulgaris* L. contains detergent-resistant membrane microdomains // Planta. 2013. V. 237. P. 859.  
<https://doi.org/10.1007/s00425-012-1800-1>
  28. Trentmann O., Haferkamp I. Current progress in tonoplast proteomics reveals insights into the function of the large central vacuole // Front Plant Sci. 2013. V. 4. P. 34.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00034>
  29. Chen T., Kirpichnikova A., Mikhaylova Yu., Shishova M. Comparison of two systems of tonoplast purification from tobacco cells of suspension culture BY-2 // Biol. Commun. 2020. V. 65. P. 178.  
<https://doi.org/10.21638/spbu03.2020.20>
  30. Ephritikhine G., Ferro M., Rolland N. Plant membrane proteomics // Plant Physiol. Biochem. 2004. V. 42. P. 943.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.11.004>
  31. Marmagne A., Rouet M.-A., Ferro M., Rolland N., Alcon C., Joyard J., Garin J., Barbier-Brygoo H., Ephritikhine G. Identification of new intrinsic proteins in Arabidopsis plasma membrane proteome // Mol. Cell. Proteomics. 2004. V. 3. P. 675.  
<https://doi.org/10.1074/mcp.M400001-MCP200>
  32. Alexandersson E., Saalbach G., Larsson C., Kjellbom P. Arabidopsis plasma membrane proteomics identifies components of transport, signal transduction and membrane trafficking // Plant Cell Physiol. 2004. V. 45. P. 1543.  
<https://doi.org/10.1093/PCP/PCH209>
  33. Yadeta K.A., Elmore J.M., Coaker G. Advancements in the analysis of the Arabidopsis plasma membrane proteome // Front. Plant Sci. 2013. V. 4: 86  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00086>
  34. Schulz B. Functional classification of plant plasma membrane transporters // Plant Cell Monogr. 2011. V. 19. P. 131.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-642-13431-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-642-13431-9_6)
  35. Testerink C., Munnik T. Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants // J. Exp. Bot. V. 62. P. 2349.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/err079>
  36. Elortza F., Mohammed S., Bunkenborg J., Foster L.J., Nühse T.S., Brodbeck U., Peck S.C., Jensen O.N. Modification-specific proteomics of plasma membrane proteins: identification and characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins released upon phospholipase D treatment. // J. Proteome Res. 2006. V. 5. P. 935.  
<https://doi.org/10.1021/pr050419u>
  37. Cacas J.-L., Furt F., Le Guédard M., Schmitter J.-M., Buré C., Gerbeau-Pissot P., Moreau P., Bessoule J.-J., Simon-Plas F., Mongrand S. Lipids of plant membrane rafts // Prog. Lipid Res. 2012. V. 51. P. 272.  
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2012.04.001>
  38. Tapken W., Murphy A.S. Membrane nanodomains in plants: capturing form, function, and movement // J. Exp. Bot. 2015. V. 66. P. 1573.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erv054>
  39. Shimaoka T., Ohnishi M., Sazuka T., Mitsuhashi N., Hara-Nishimura I., Shimazaki K.-I., Maeshima M., Yokota A., Tomizawa K.-I., Mimura T. Isolation of intact vacuoles and proteomic analysis of tonoplast from suspension-cultured cells of *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell Physiol. 2004. V. 45. P. 672.  
<https://doi.org/10.1093/pcp/pch099>
  40. Jaquinod M., Villiers F., Kieffer-Jaquinod S., Hugouvieux 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>

41. Dunkley T.P.J., Hester S., Shadforth I.P., Runions J., Weimar T., Hanton S.L., Griffin J.L., Bessant C., Brandizzi F., Hawes C., Watson R.B., Dupree P., Lilley K.S. Mapping the Arabidopsis organelle proteome // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 6518. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506958103>
42. Parsons H.T., Christiansen K., Knierim B., Carroll A., Ito J., Bath T.S., Smith-Moritz A.M., Morrison S., McInerney P., Hadi M.Z., Auer M., Mukhopadhyay A., Petzold C.J., Scheller H.V., Loqué D., Heazlewood J.L. Isolation and proteomic characterization of the Arabidopsis Golgi defines functional and novel components involved in plant cell wall biosynthesis // Plant Physiol. 2012. V. 159. P. 12. <https://doi.org/10.1104/pp.111.193151>
43. Wang X., Komatsu S. Plant subcellular proteomics: Application for exploring optimal cell function in soybean // J. Proteomics. 2016. V. 143. P. 45. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.01.011>
44. Takahashi D., Kawamura Y., Yamashita T., Uemura M. Detergent-resistant plasma membrane proteome in oat and rye: similarities and dissimilarities between two monocotyledonous plants // J. Proteome Res. 2012. V. 11. P. 1654. <https://doi.org/10.1021/pr200849v>
45. Krishnamurthy P., Tana X.F., Lima T.K., Lima T.-M., Kumar P.P., Loh C.-S., Lin Q. Data in support of the proteomic analysis of plasma membrane and tonoplast from the leaves of mangrove plant *Avicennia officinalis* // Data Brief. 2015. V. 5. P. 646. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.10.016>
46. Datta R., Kumar D., Chattopadhyay S. Membrane proteome profiling of *Mentha arvensis* leaves in response to *Alternaria alternata* infection identifies crucial candidates for defense response // Plant Signaling Behav. 2018. V. 13: e1178423. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1178423>
47. Nilsson R., Bernfur K., Gustavsson N., Bygdell J., Wingsle G., Larsson C. Proteomics of plasma membranes from poplar trees reveals tissue distribution of transporters, receptors, and proteins in cell wall formation // Mol. Cell. Proteomics. 2010. V. 9. P. 368. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900289-MCP200>
48. Iwasaki Y., Itoh T., Hagi Y., Matsuta S., Nishiyama A., Chaya G., Kobayashi Y., Miura K., Komatsu S. Proteomics analysis of plasma membrane fractions of the root, leaf, and flower of rice // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. 6988. <https://doi.org/10.3390/ijms21196988>
49. Furt F., Simon-Plas F., Mongrand S. Lipids of the plant plasma membrane // Plant Cell Monogr. 2011. V. 19. P. 3. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-13431-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-13431-9_1)
50. Paradies G., Paradies V., De Benedictis V., Ruggiero F.M., Petrosillo G. Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics // BBA-Bioenergetics. 2014. V. 1837. P. 408. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.10.006>
51. Cassim A.M., Gouguet P., Gronnier J., Laurent N., Germain V., Grison M., Boutté Y., Gerbeau-Pissot P., Simon-Plas F., Mongrand S. Plant lipids: Key players of plasma membrane organization and function // Prog. Lipid Res. 2019. V. 73. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.11.002>
52. Boudière L., Michaud M., Petroustos D., Rébeillé F., Falconet D., Bastien O., Roy S., Finazzi G., Rolland N., Jouhet J., Block M.A., Maréchal E. Glycerolipids in photosynthesis: Composition, synthesis and trafficking // BBA-Bioenergetics. 2014. V. 1837. P. 470. <http://doi.doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.09.007>
53. Okazaki Y., Otsuki H., Narisawa T., Kobayashi M., Sawai S., Kamide Y., Kusano M., Aoki T., Hirai M.Y., Saito K. A new class of plant lipid is essential for protection against phosphorus depletion // Nat. Commun. 2013. V. 4: 1510. <https://doi.org/10.1038/ncomms2512>
54. Li-Beisson Y., Shorrosh B., Beisson F., Andersson M.X., Arondel V., Bates P.D., Baud S., Bird D., DeBono A., Durrett T.P., Franke R.B., Graham I.A., Katayama K., Kelly A.A., Larson T., et al. Acyl-lipid metabolism // Arabidopsis Book. 2013. V. 11: e0161. <https://doi.org/10.1199/tab.0161>
55. Merrill A.H., Jr., Sullards M.C. Opinion article on lipidomics: inherent challenges of lipidomic analysis of sphingolipids // BBA-Mol. Cell Biol. L. 2017. V. 1862. P. 774. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2017.01.009>
56. Pata M.O., Hannun Y.A., Ng C.K-Y. Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx // New Phytol. 2010. V. 185. P. 611. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03123.x>
57. Valitova J.N., Sulkarnayeva A.G., Minibayeva F.V. Plant sterols: diversity, biosynthesis, and physiological functions // Biochemistry. 2016. V. 81. P. 819. <https://doi.org/10.1134/S0006297916080046>
58. Moreau P., Bessoule J.J., Mongrand S., Testet E., Vincent P., Cassagne C. Lipid trafficking in plant cells // Prog. Lipid Res. 1998. V. 37. P. 371. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(98\)00016-2](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(98)00016-2)
59. Garab G., Ughy B., Goss R. Role of MGDG and non-bilayer lipid phases in the structure and dynamics of chloroplast thylakoid membranes // Subcell. Biochem. 2016. 86. P. 127. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-25979-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-25979-6_6)
60. Tjellström H., Hellgren L.I., Wieslander Å., Sandelius A.S. Lipid asymmetry in plant plasma membranes: phosphate deficiency-induced phospholipid replacement is restricted to the cytosolic leaflet // FASEB J. 2010. V. 24. P. 1128. <https://doi.org/10.1096/fj.09-139410>
61. Horvath S.E., Daum G. Lipids of mitochondria // Prog. Lipid Res. 2013. V. 52. P. 590. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.07.002>
62. Zhang C., Hicks G.R., Raikhel N.V. Molecular composition of plant vacuoles: Important but less understood regulations and roles of tonoplast lipids // Plants. 2015. V. 4: 320-333; <https://doi.org/10.3390/plants4020320>
63. Michaud M., Prinz W.A., Jouhet J. Glycerolipid synthesis and lipid trafficking in plant mitochondria // FEBS J. 2017. V. 284. P. 376. <https://doi.org/10.1111/febs.13812>
64. Fouillen L., Maneta-Peyret L., Moreau P. ER membrane lipid composition and metabolism: lipidomic

- analysis // *Methods Mol. Biol.* 2018. V. 1691. P. 125. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7389-7\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7389-7_10)
65. Markham J.E., Lynch D.V., Napier J.A., Dunn T.M., Cahoon E.B. Plant sphingolipids: function follows form // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2013. V. 16. P. 350. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.02.009>
66. Нестёркина И.С., Озолина Н.В., Бадыев Б.К., Федорова Г.А., Нурминский В.Н., Спиридонова Е.В., Салеев Р.К. Рафты вакуолярной мембраны столовой свеклы содержат V-H<sup>+</sup>-АТФ-азу // *Биологические мембраны*. 2016. Т. 33. С. 450. <https://doi.org/10.7868/S0233475516060098>
67. König S., Mosblech A., Heilmann I. Stress-inducible and constitutive phosphoinositide pools have distinctive fatty acid patterns in *Arabidopsis thaliana* // *FASEB J.* 2007. V. 21. P. 1958. <https://doi.org/10.1096/FJ.06-7887COM>
68. Sacas J.-L., Buré C., Grosjean K., Gerbeau-Pissot P., Lherminier J., Rombouts Y., Maes E., Bossard C., Gronnier J., Furt F., Fouillen L., Germain V., Bayer E., Cluzet S., Robert F., et al. Revisiting plant plasma membrane lipids in tobacco: a focus on sphingolipids // *Plant Physiol.* 2016. V. 170. P. 367. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00564>
69. Nyholm T.K.M. Lipid-protein interplay and lateral organization in biomembranes // *Chem. Phys. Lipids*. 2015. V. 189. P. 48. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2015.05.008>
70. Grison M.S., Brocard L., Fouillen L., Nicolas W., Wewer V., Dörmann P., Nacir H., Benitez-Alfonso Y., Claverol S., Germain V., Bouütté Y., Mongrand S., Bayer E.M. Specific membrane lipid composition is important for plasmodesmata function in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2015. V. 27. P. 1228. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.135731>
71. Gronnier J., Crowet J.-M., Habenstein B., Nasir M.N., Bayle V., Hossy E., Platre M.P., Gouguet P., Raffaele S., Martínez D., Grelard A., Loquet A., Simon-Plas F., Gerbeau-Pissot P., Der C., et al. Structural basis for plant plasma membrane protein dynamics and organization into functional nanodomains // *eLife*. 2017. V. 6: e26404. <https://doi.org/10.7554/eLife.26404>
72. van Meer G., Voelker D.R., Feigenson G.W. Membrane lipids: where they are and how they behave // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2008. V. 9. P. 112. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>
73. Nohzadeh M.S., Habibi R.M., Heidari M., Salekdeh G.H. Proteomics reveals new salt responsive proteins associated with rice plasma membrane // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2007. V. 71. P. 2144. <https://doi.org/10.1271/bbb.70027>
74. Cheng Y., Qi Y., Zhu Q., Chen X., Wang N., Zhao X., Chen H., Cui X., Xu L., Zhang W. New changes in the plasma-membrane-associated proteome of rice roots under salt stress // *Proteomics*. 2009. V. 9. P. 3100. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800340>
75. Witzel K., Matros A., Möller A.L.B., Ramireddy E., Finnie C., Peukert M., Rutten T., Herzog A., Kunze G., Melzer M., Kaspar-Schoenefeld S., Schmölling T., Svensson B., Mock H.-P. Plasma membrane proteome analysis identifies a role of barley membrane steroid binding protein in root architecture response to salinity // *Plant Cell Environ.* 2018. V. 41. P. 1311. <https://doi.org/10.1111/pce.13154>
76. Takahashi D., Li B., Nakayama T., Kawamura Y., Uemura M. Plant plasma membrane proteomics for improving cold tolerance // *Front. Plant Sci.* 2013. V. 4: 90. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00090>
77. Miki Y., Takahashi D., Kawamura Y., Uemura M. Temporal proteomics of *Arabidopsis* plasma membrane during cold- and deacclimation // *J. Proteomics*. 2019. V. 197. P. 71. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.11.008>
78. Komatsu S., Hashiguchi A. Subcellular proteomics: application to elucidation of flooding-response mechanisms in soybean // *Proteomes*. 2018. V. 6: 13. <https://doi.org/10.3390/proteomes6010013>
79. Elmore J.M., Liu J., Smith B., Phinney B., Coaker G. Quantitative proteomics reveals dynamic changes in the plasma membrane during *Arabidopsis* immune signaling // *Mol. Cell. Proteomics*. 2012. V. 11: M111.014555. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.014555>
80. Aloui A., Recorbet G., Lemaitre-Guillier C., Mounier A., Balliau T., Zivy M., Wipf D., Dumas-Gaudot E. The plasma membrane proteome of *Medicago truncatula* roots as modified by arbuscular mycorrhizal symbiosis // *Mycorrhiza*. 2018. V. 28. P. 1. <https://doi.org/10.1007/s00572-017-0789-5>
81. Wienkoop S., Saalbach G. Proteome analysis. Novel proteins identified at the peribacteroid membrane from *Lotus japonicus* root nodules // *Plant Physiol.* 2003. V. 131. P. 1080. <https://doi.org/10.1104/pp.102.015362>
82. Kutschera U., Deng Z., Oses-Prieto J.A., Burlingame A.L., Wang Z.-Y. Cessation of coleoptile elongation and loss of auxin sensitivity in developing rye seedlings: A quantitative proteomic analysis // *Plant Signaling Behav.* 2010. V. 5. P. 509. <https://doi.org/10.4161/psb.11210>
83. Zhu J., Chen S., Alvarez S., Asirvatham V.S., Schachtman D.P., Wu Y., Sharp R.E. Cell wall proteome in the maize primary root elongation zone. I. Extraction and identification of water-soluble and lightly ionically bound proteins // *Plant Physiol.* 2006. V. 140. P. 311. <https://doi.org/10.1104/pp.105.070219>
84. Zhu J., Alvarez S., Marsh E.L., LeNoble M.E., Cho I.-J., Sivaguru M., Chen S., Nguyen H.T., Wu Y., Schachtman D.P., Sharp R.E. Cell wall proteome in the maize primary root elongation zone. II. Region-specific changes in water soluble and lightly ionically bound proteins under water deficit // *Plant Physiol.* 2007. V. 145. P. 1533. <https://doi.org/10.1104/pp.107.107250>
85. Zhang Z., Voothuluru P., Yamaguchi M., Sharp R.E., Peck S.C. Developmental distribution of the plasma membrane-enriched proteome in the maize primary root growth zone // *Front. Plant Sci.* 2013. V. 4: 33. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00033>
86. Li B., Takahashi D., Kawamura Y., Uemura M. Plasma membrane proteome analyses of *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells during cold or ABA treatment: relationship with freezing tolerance and growth phase // *J. Proteomics*. 2020. V. 211: 103528 <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103528>

87. *Pertl H., Schulze W.X., Obermeyer G.* The pollen organelle membrane proteome reveals highly spatial-temporal dynamics during germination and tube growth of lily pollen // *J. Proteome Res.* 2009. V. 8. P. 5142.  
<https://doi.org/10.1021/pr900503f>
88. *Yang N., Wang T.* Comparative proteomic analysis reveals a dynamic pollen plasma membrane protein map and the membrane landscape of receptor-like kinases and transporters important for pollen tube growth and interaction with pistils in rice // *BMC Plant Biol.* 2017. V. 17: 2.  
<https://doi.org/10.1186/s12870-016-0961-7>
89. *Pontiggia D., Spinelli F., Fabbri C., Licursi V., Negri R., De Lorenzo G., Mattei B.* Changes in the microsomal proteome of tomato fruit during ripening // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. 14350  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-50575-5>
90. *Zhang J., Ma H., Feng J., Zeng L., Wang Z., Chen S.* Grape berry plasma membrane proteome analysis and its differential expression during ripening // *J. Exp. Bot.* 2008. V. 59. P. 2979.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/ern156>
91. *Liu R., Wang Y., Qin G., Tian S.* iTRAQ-based quantitative proteomic analysis reveals the role of the tonoplast in fruit senescence // *J. Proteomics.* 2016. V. 146. P. 80.  
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.06.031>
92. *Nakamura Y.* Membrane lipid oscillation: an emerging system of molecular dynamics in the plant membrane // *Plant Cell Physiol.* 2018. V. 59. P. 441.  
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcy023>
93. *Zhang H., Dong J., Zhao X., Zhang Y., Ren J., Xing L., Jiang C., Wang X., Wang J., Zhao S., Yu H.* Research progress in membrane lipid metabolism and molecular mechanism in peanut cold tolerance // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10: 838.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00838>
94. *Niu Y., Xiang Y.* An overview of biomembrane functions in plant responses to high-temperature stress // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9: 915.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00915>
95. *Moradi P., Mahdavi A., Khoshkam M., Iriti M.* Lipidomics unravels the role of leaf lipids in thyme plant response to drought stress // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18: 2067.  
<https://doi.org/10.3390/ijms18102067>
96. *Okazaki Y., Nishizawa T., Takano K., Ohnishi M., Mimura T., Saito K.* Induced accumulation of glucuronosyldiacylglycerol in tomato and soybean under phosphorus deprivation // *Physiol. Plant.* 2015. V. 155. P. 33.  
<https://doi.org/10.1111/pp1.12334>
97. *Yu D., Boughton B.A., Hill C.B., Feussner I., Roessner U., Rupasinghe T.W.T.* Insights into oxidized lipid modification in barley roots as an adaptation mechanism to salinity stress // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11: 1.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00001>
98. *Siebers M., Brands M., Wewer V., Duan Y., Hölzl G., Dörmann P.* Lipids in plant-microbe interactions // *BBA-Mol. Cell Biol. L.* 2016. V. 1861. P. 1379.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.02.021>
99. *Ischebeck T.* Lipids in pollen - they are different // *BBA-Mol. Cell Biol. L.* 2016. V. 1861. P. 1315.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.03.023>
100. *Liu G.-J., Xiao G.-H., Liu N.-J., Liu D., Chen P.-S., Qin Y.-M., Zhu Y.-X.* Targeted lipidomics studies reveal that linolenic acid promotes cotton fiber elongation by activating phosphatidylinositol and phosphatidylinositol monophosphate biosynthesis // *Mol. Plant.* 2015. V. 8. P. 911.  
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.02.010>

УДК 581.1

**ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *uidA* ПОД УПРАВЛЕНИЕМ  
ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫХ ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ *AP3* И *RPT2a*  
*Arabidopsis thaliana* L. В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ *Nicotiana tabacum* L.**

© 2021 г. Ю. В. Сидорчук<sup>а, \*</sup>, Т. В. Маренкова<sup>а</sup>, В. В. Кузнецов<sup>а</sup>,  
И. М. Герасименко<sup>б</sup>, Ю. В. Шелудько<sup>б</sup>, Е. В. Дейнеко<sup>а</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>Технический университет Дармштадта, факультет биологии, группа биотехнологии растений и метаболической  
инженерии, Дармштадт, ФРГ

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

Поступила в редакцию 05.09.2020 г.

После доработки 03.11.2020 г.

Принята к публикации 03.11.2020 г.

Исследованы особенности экспрессии репортерного гена *uidA*, кодирующего фермент β-глюкуронидазу, под управлением тканеспецифичных промоторов генов *AP3* и *RPT2a Arabidopsis thaliana* L. в гомозиготных моноинсерционных трансгенных растениях *Nicotiana tabacum* L. Оба используемых промотора обеспечивали экспрессию репортерного гена в меристематических тканях растений табака, хотя для промотора *AP3* выявленный тип экспрессии является эктопическим. В исследованных группах независимых трансформантов и их гибридах выявлена широкая вариабельность как по накоплению мРНК, так и по ферментативной активности β-глюкуронидазы. Показано, что уровень накопления транскрипта репортерного гена *uidA* не коррелирует с уровнем ферментативной активности его продукта. Выявленная вариабельность среди анализируемых трансгенных растений табака вероятнее всего связана с особенностями организации хроматина в районах Т-ДНК инсерций и (или) обусловлена различным характером взаимодействий между цис-элементами исследуемых промоторов и растительными регуляторными элементами, расположенными вне района Т-ДНК инсерции. По результатам биоинформатического анализа в структуре исследуемых промоторов выявлено около 20-ти цис-регуляторных элементов, часть из которых обнаруживались в обоих исследуемых промоторах. В целом результаты анализа показали, что промоторы генов *AP3* и *RPT2a A. thaliana* могут быть эффективны в качестве регуляторных элементов для экспрессии трансгенов в меристематических тканях других видов растений, в частности, *N. tabacum*.

**Ключевые слова:** *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*, промоторы, тканеспецифичная экспрессия, трансгенез, репортерный ген, цис-элементы

DOI: 10.31857/S0015330321040175

## ВВЕДЕНИЕ

Современные технологии модификации растений, направленные на улучшение хозяйственно-ценных признаков важных сельскохозяйственных культур, предполагают использование двух основных подходов – трансгенез и геномное редактирование. В случае создания трансгенных растений в растительный геном вводятся фрагменты экзогенных ДНК, включающие гены из различных гетерологических систем, в случае редактирования – гены, кодирующие белки с нуклеазной активностью. Успешность применения этих подходов в значительной степени зависит от наличия в арсенале исследователей достаточно большого набора регуляторных генетических элементов, в том числе

и промоторов, используемых для создания генно-инженерного инструментария. В настоящее время для этих целей применяют промоторы, различающиеся по проявляемой ими активности, например, конститутивные, индуцибельные, тканеспецифичные [1–4]. Использование тканеспецифичных промоторов представляет особый интерес для исследователей, поскольку их применение дает возможность выявлять функционирование генов в определенных типах тканей, а также направленно экспрессировать в них чужеродные целевые гены [1, 4, 5]. Применение данного подхода основано на консервативности регуляторных элементов, детерминирующих экспрессию генов в каком-либо типе тканей растения. Этот факт предполагает возможность использовать их для регуляции экс-

прессии чужеродного гена в аналогичном типе тканей других видов растений. Поиск новых тканеспецифичных промоторов и оценка активности их экспрессии в гетерологичных растительных геномах с помощью репортерных генов является важным этапом при создании трансгенных растений с заданными хозяйственно-ценными признаками [6–8].

Тканеспецифичные промоторы, обеспечивающие экспрессию целевых генов в меристематических тканях растений, представляют особый интерес для биотехнологии, в частности, при культивировании активно делящихся клеток – продуцентов рекомбинантных белков. Ген *APETALA3* (*AP3*) экспрессируется в цветочных меристемах *A. thaliana* и кодирует фактор транскрипции группы В, регулирующий развитие цветка [9, 10]. Ген *RPT2a* кодирует АТФазу в составе 19S регуляторной субъединицы 26S протеасомы *A. thaliana* и экспрессируется преимущественно в апикальных меристемах корня и стебля [6, 11]. Представляет интерес исследование возможности применения промоторов этих генов в генетических конструкциях в качестве регуляторных элементов и оценка особенности их регуляции в гетерологичных системах. Целью данной работы было выявление особенностей экспрессии гена *uidA* под управлением тканеспецифичных промоторов генов *AP3* и *RPT2a* *A. thaliana* в трансгенных растениях *N. tabacum*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Растительный материал.** В качестве исходного материала использовали моноинсерционные гомозиготные ( $T_2$ ) трансгенные растения табака (*N. tabacum* L., сорт Petit Havana, линия SR1) и их гибриды ( $F_1$ ). Исходные трансформанты ( $T_0$ ) табака были получены нами ранее методом агробактериального переноса двух генетических конструкций на основе вектора pBIN19 [12]. Генетические конструкции включали репортерный ген *uidA* под управлением промотора гена *AP3* или гена *RPT2a*. Промотор гена *AP3* длиной 620 п.н. от точки старта транскрипции в сочетании с 5'-НТР ВТМ (5'-нетранслируемый район вируса табачной мозаики), а также промотор и 5'-НТР гена *RPT2a* длиной 1667 п.н. от стартового кодона были амплифицированы с геномной ДНК *A. thaliana*. В работе были проанализированы потомки  $T_2$  7-ми независимо полученных моноинсерционных линий с промотором гена *AP3* (линии a1–a7) и 8-ми – с промотором гена *RPT2a* (линии g1–g8).

Отбор моноинсерционных гомозиготных линий проводили с использованием общепринятого теста на устойчивость к антибиотику канамицину в поколениях  $T_1$  и  $T_2$ . Для получения семян от самоопыления и последующего их анализа соцветия трансформантов предварительно изоли-

ровали пергаментными колпачками. Собранные отдельно из каждой коробочки семена анализировали по устойчивости к селективному агенту при посеве на стандартную агаризованную МС-среде с добавлением антибиотика канамицина в концентрации 200 мг/л. В  $T_1$  для дальнейшего анализа отбирали генотипы с расщеплением по устойчивости к канамицину  $3K_m^+ : 1K_m^-$  (зеленые : белые), что свидетельствовало об единичной инсерции трансгена. Устойчивые к антибиотику генотипы выращивали в теплице, самоопыляли для получения поколения  $T_2$  и вновь тестировали по устойчивости к антибиотику. Моноинсерционные гомозиготные растения  $T_2$ , не дающие расщепления (все зеленые) на среде с канамицином, использовали для изучения особенностей экспрессии *uidA*-гена под управлением исследуемых тканеспецифичных промоторов. Гибриды  $F_1$  между моноинсерционными гомозиготными растениями получали с помощью искусственного опыления путем нанесения пыльцы на пестики предварительно изолированных и кастрированных цветков в соответствии с типом изучаемого промотора.

Растения выращивали в условиях гидропонной теплицы с фотопериодом 16/8 ч и при температуре 22/18°C (день/ночь).

**Гистохимическое выявление экспрессии гена *uidA* в тканях трансгенных растений табака (GUS-окрашивание).** Для выявления особенностей экспрессии гена *uidA* под управлением исследуемых промоторов в цветках в качестве модели использовали бутоны трансгенных растений табака на стадиях развития II, IV и VI согласно классификации по Koltunow с соавт. [13]. Для анализа особенностей экспрессии гена *uidA* в апикальных меристемах корня и стебля моноинсерционных гомозиготных растений  $T_2$  и их гибридов  $F_1$  использовали 6-ти недельные растения табака. Для этого стерилизованные 96%-ным этанолом семена с последующей их двукратной промывкой стерильной дистиллированной водой высевали на агаризованную МС-среду с добавлением антибиотика канамицина (200 мг/л). Растения выращивали из семян в условиях факторостатной комнаты при освещении 10 клк, фотопериоде 16/8 ч (день/ночь) и температуре 24°C. Окрашивание бутонов и растений в возрасте 6-ти недель проводили в реакционной смеси следующего состава: 100 мМ фосфатный буфер (pH = 7.0), 10 мМ EDTA, 0.1% Triton X100 и 1 мМ X-Gluc (Fermentas, США). Для улучшения качества окрашивания свежий растительный материал в реакционной смеси помещали в камеру геной пушки (PSD-1000/He, Biogad, США) и удаляли воздух с помощью вакуумирования. Обработанный таким образом материал оставляли на ночь в термостате при температуре 37°C. После окрашивания материал отмывали от хлорофилла 70%-ным этанолом.

**Количественное определение активности репортерного белка  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS).** Измерение активности GUS в экстрактах растений табака проводили в соответствии со стандартной методикой [14]. Для получения белковых экстрактов 6-ти недельные растения (общей массой около 150 мг) гомогенизировали в 200 мкл экстракционного буфера следующего состава: 50 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.0, 10 мМ ЭДТА, 0.1% Triton X-100, 0.1% лауроилсаркозин натрия соль, 10 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол. Флуоресценцию измеряли на флуориметре Victor3 1420 ("Perkin Elmer", США) при длине волны возбуждения 355 нм и длине волны испускания 455 нм. Калибровку флуоресценции проводили с помощью стандартного раствора 1 мМ 4-метилумбеллиферона (4-MU, Sigma-Aldrich, США) в 0.2 М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Активность  $\beta$ -глюкуронидазы рассчитывали после определения общего растворимого белка в экстрактах по методу

Bradford [15] с использованием раствора БСА в экстракционном буфере в качестве стандарта. Измерения проводили в 3 биологических повторностях. Для выявления различий между группами применяли непараметрический дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса (программный пакет Statistica 5.5). Критическое значение уровня значимости принималось равным 5%.

**Анализ экспрессии гена *uidA*.** Суммарную РНК выделяли из тканей 6-ти недельных растений с помощью набора реактивов RNeasy® Plant Mini Kit (Quiagen, Германия), РНК обрабатывали DNase I и 4  $\mu\text{g}$  РНК брали для синтеза кДНК (Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, США).

Анализ экспрессии гена *uidA* проводили при помощи ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). Структура праймеров и зондов следующая:

*gsp\_прямой* – 5'-TGGAAACTTTAGGGTCCTTACTAC-3',  
*gsp\_обратный* – 5'-CAAGCCTTGTAGTGAGCATCTG-3',  
*gsp\_зонд* – 5'-FAM-ATGACTTATCCGCTCCAGCACCCAC-BHQ1-3';  
*uidA\_прямой* – 5'-CTTCCATGATTTCTTTAACTATGC-3',  
*uidA\_обратный* – 5'-GCACAGTTCATAGAGATAACC-3',  
*uidA\_зонд* – 5'-FAM-TACACCACGCCGAACACCTG-BHQ1-3'.

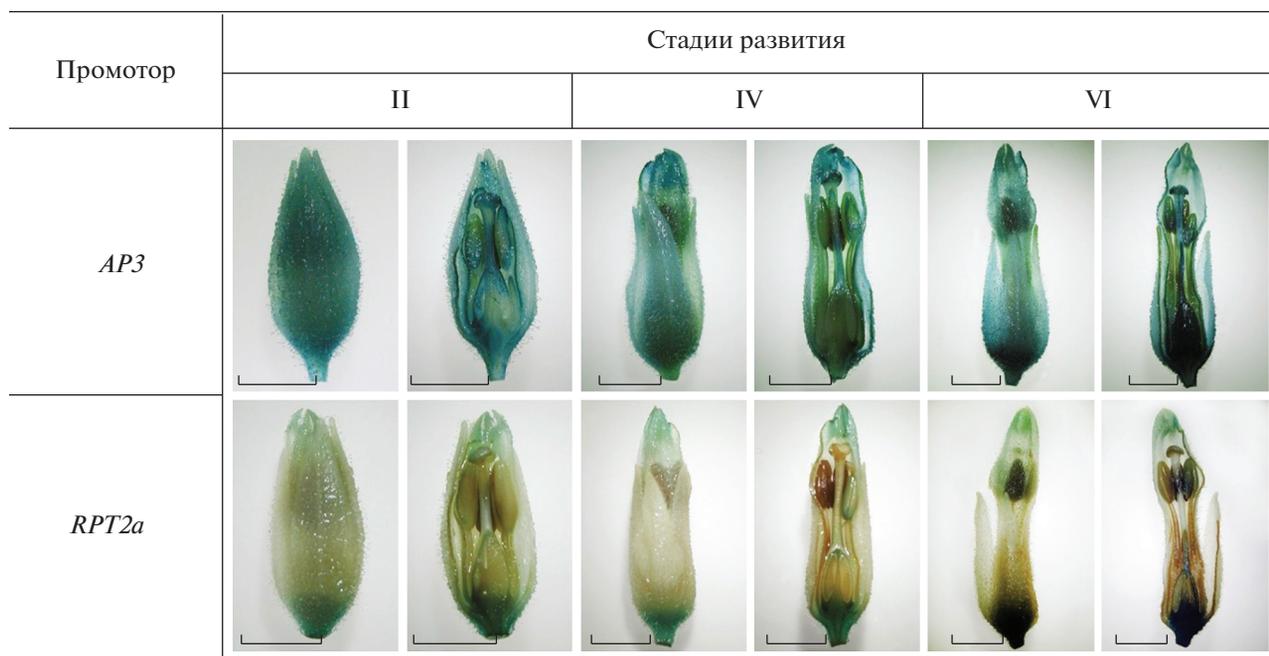
Программа амплификации: 95°C – 3 мин, далее 5 циклов без детекции (95°C – 10 сек, 61°C – 20 сек, 72°C – 5 сек); затем 40 циклов с детекцией на стадии отжига (канал FAM): 95°C – 10 сек, 61°C – 20 сек, 72°C – 5 сек. Каждый образец амплифицировали в трех аналитических повторностях. Уровень экспрессии оценивали при помощи ПО "Bio-Rad CFX Manager 2.1". Уровень экспрессии гена *uidA* выражали в процентах относительно экспрессии гена *GSP* табака, кодирующего глутаминсинтетазу.

**Биоинформатический анализ тканеспецифических промоторов генов *AP3* и *RPT2a A. thaliana*.** Для предварительной обработки и анализа нуклеотидных последовательностей с использованием общедоступных баз данных использовали онлайн ресурсы Blast ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)) и Clustalo (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>). Для биоинформатического анализа нуклеотидных последовательностей исследуемых промоторов использовали программы PLACE (<https://sogo.dna.affrc.go.jp/cgi-bin/sogo.cgi?lang=en&pj=640&action=page&page=new-place>), PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>) в соответствии с руководством и рекомендациями разработчиков, а также TSSP и Softberry (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=tssp&group=programs&subgroup=promoter>).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Особенности экспрессии *uidA* гена в различных тканях трансгенных растений табака.** Результаты сравнительного анализа особенностей экспрессии гена *uidA* под управлением промоторов тканеспецифических генов *AP3* и *RPT2a* на модели цветков трансгенных растений табака на стадиях развития II, IV и VI представлены на рис. 1. Интенсивность и локализация гистохимического окрашивания элементов цветка и околоцветника в анализируемых группах трансгенных растений существенно различалась, что свидетельствовало об особенностях функционирования исследуемых регуляторных элементов. В цветках растений табака, у которых *uidA* ген находился под управлением промотора гена *AP3*, на всех исследуемых стадиях развития (рис. 1) синее GUS-окрашивание гистохимически выявлялось во всех элементах цветка (за исключением тычиночных нитей). Интенсивность окрашивания цветков у 7-ми независимо полученных трансгенных растений табака варьировала, однако характер окрашивания элементов развивающихся цветков и околоцветников в целом оставался одинаковым.

Ген *AP3* согласно ABC-модели флорального морфогенеза в цветках *A. thaliana* кодирует транскрипционный фактор группы В и экспрессируется только в лепестках и тычинках [9, 16]. Наличие GUS-окрашивания во всех остальных частях



**Рис. 1.** Особенности гистохимического GUS-окрашивания тканей цветков на трех стадиях их развития у трансгенных растений табака с геном *uidA* под управлением тканеспецифичных промоторов генов *AP3* и *RPT2a* *A. thaliana*. Масштабная линейка — 5 мм.

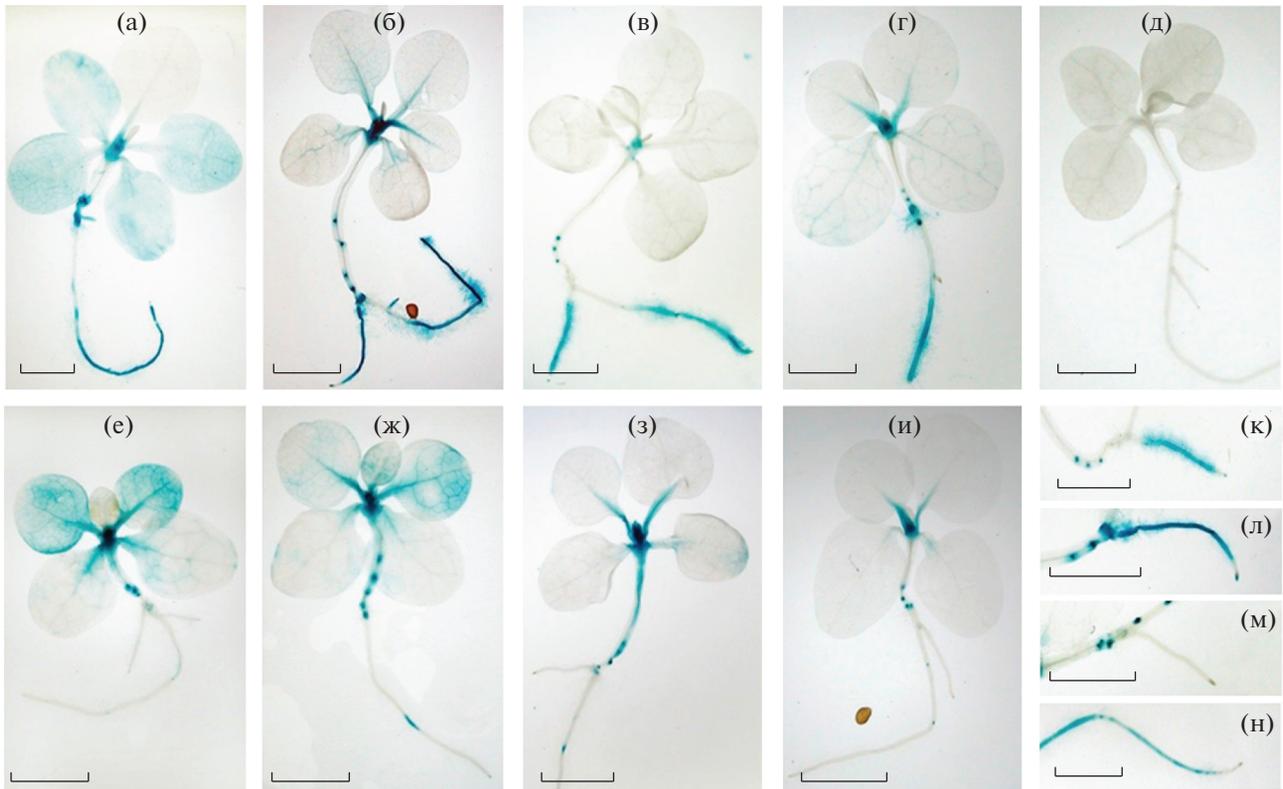
цветка и околоцветника носит эктопический характер. Ранее анализ активности промотора гена *AP3* по характеру распределения GUS-окрашивания был проведен на примере трансгенных растений *A. thaliana*, то есть в его исходном генетическом окружении, и эктопической экспрессии обнаружено не было [10, 17]. Более того, было показано, что длина минимального промотора, обеспечивающего корректную по времени и месту локализации экспрессию репортерного гена *uidA* в трансгенных растениях *A. thaliana*, находится в границах 556 – 727 п.н. от точки старта транскрипции [10]. В соответствии с этим клонированный нами фрагмент промотора длиной 620 п.н. от точки старта транскрипции должен содержать набор цис-регуляторных элементов, необходимых для корректной экспрессии репортерного гена. Тем не менее, регуляция экспрессии факторов транскрипции генов флорального морфогенеза весьма сложна. Известно, что положительным активатором транскрипции гена *AP3*, например, является ген идентичности флоральной меристемы *API* [16]. Предполагается, что *API* может действовать в комбинации с другими кофакторами для подавления эктопической экспрессии *AP3* в первом и четвертом кругах флоральной меристемы, возможно, путем прямого связывания с блоком *CArG 3* [10]. В геноме табака обнаружено как минимум два *API*-подобных гена, экспрессирующихся в цветках [7]. Вполне возможно, что данные транскрипционные факторы табака по каким-то причи-

нам не взаимодействуют с используемым нами фрагментом промотора гена *AP3* *A. thaliana* и, соответственно, не могут ограничить его транскрипционную активность только правильными, 2-м и 3-м кругами флоральной меристемы. Однако данное предположение требует дополнительных исследований.

Можно допустить также, что эктопический характер GUS-окрашивания в исследованных нами растениях объясняется использованием омега-лидерной последовательности *WTM* [18] вместо нативного 5'-НТР гена *AP3* *A. thaliana*. Эта замена была предпринята с целью усиления уровня трансляции трансгена, однако известно, что в ряде случаев тканеспецифичность накопления белка определяется не только на транскрипционном, но и на трансляционном уровне [19].

В цветках растений табака с геном *uidA* под управлением промотора гена *RPT2a* на всех исследуемых стадиях развития GUS-окрашивание выявлялось в цветоножке и цветолохе, и очень слабое – в развивающихся лепестках (рис. 1). Окрашивание таких элементов цветка как пестик, завязь, тычинки и тычиночные нити отсутствовало. Слабый характер окрашивания отдельных элементов цветка, либо полное отсутствие окрашивания, было характерно для всех 8-ми независимо полученных трансгенных растений табака.

Ген *RPT2a*, кодирующий АТФазу в составе 19S регуляторной субъединицы 26S протеасомы у *A. thaliana*, необходим для поддержания клеточ-



**Рис. 2.** Особенности гистохимического окрашивания тканей у двух групп трансгенных растений табака с геном *uidA* под управлением тканеспецифичных промоторов генов *AP3* и *RPT2a* *A. thaliana*. (а) – (в), (к), (л) – растения *AP3*; (г) – гибрид  $F_1$  *AP3*; (е) – (з), (м), (н) – растения *RPT2a*; (и) – гибрид  $F_1$  *RPT2a*; (д) – нетрансгенный контроль SR1. Масштабная линейка – 3 мм.

ной организации апикальных меристем вегетативных тканей [6, 11]. Его действие заключается в регулировании времени и направления деления клеток как в меристемах побегов, так и в меристемах корней [11]. Кроме того, показано, что *RPT2a* ингибирует переход от митоза к эндоредупликации в контрольной точке G2/M клеточного цикла [6].

Известно, что в геноме *A. thaliana* RPT2 АТФаза 19S регуляторной субъединицы 26S протеасомы кодируется двумя дублированными генами *RPT2a* и *RPT2b*. Транскрипты этих генов обнаруживаются в самых различных тканях и органах, включая стебли, листья, корни и даже цветочные бутоны, а их белковые продукты обладают высокой степенью гомологии и различаются всего тремя аминокислотными остатками [6, 11]. Таким образом, *RPT2a* и *RPT2b* промоторы *A. thaliana* обеспечивают определенный уровень экспрессии гена *uidA* и после превращения вегетативной меристемы в генеративную, что позволяет объяснить наличие GUS-окрашивания в отдельных элементах цветка и околоцветника у трансгенных растений табака.

На рис. 2 представлены результаты сравнительного анализа GUS-окрашивания трансгенных растений табака, различающихся между собой по двум типам промоторов генов *AP3* и *RPT2a*

*A. thaliana*. Гистохимическое окрашивание выявлялось в апикальных меристемах стебля, вдоль листовых жилок семядолей и первых настоящих листьев (рис. 2а–г; е–и). Ткани гипокотыля у моноинсерционных гомозиготных растений, за редким исключением (рис. 2з), не окрашивались. Также GUS-активность выявлялась во вторичных меристемах зон ветвления корней, в меристемах кончиков корней и в тканях корня, иногда захватывая зону корневых волосков (рис. 2к–н).

Интересен тот факт, что несмотря на вариабельность GUS-окрашивания у независимых трансформантов и их гибридных комбинаций, наблюдаемая картина была схожа для обеих групп исследуемых растений табака. Однако, если для промотора гена *RPT2a* наблюдаемый тип экспрессии *uidA* гена является нормой, то для промотора гена *AP3*, кодирующего фактор транскрипции флорального морфогенеза *A. thaliana*, экспрессия в меристемах и тканях вегетативных органов является эктопической. У мутанта *A. thaliana* по гену *CLF* (*curly leaf*), относящегося к семейству генов *polycomb*, наличие транскрипта *AP3* детектировалось в листьях [20]. Тем не менее выявленный нами тип эктопического проявления гена *uidA* под

**Таблица 1.** Специфичность экспрессии гена *uidA* в тканях и органах трансформантов табака.

Промотор	Меристемы		Элементы цветка и околоцветника					
	стеблевая	корневая	цветоножка и цветоложе	чашелистики	лепестки	тычинки	пестик	завязь
<i>AP3</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>RPT2a</i>	+	+	+	–	+	–	–	–

управлением промотора гена *AP3* ранее описан в литературе не был.

Показано, что распределение GUS-активности в трансгенных растениях *A. thaliana* детерминированной геном *uidA* под управлением *RPT2a* и *RPT2b* промоторов в целом является сходным и отражает локализацию мРНК. Тем не менее, *RPT2a* промотор обеспечивает более высокую активность репортерного гена в меристемах побегов, а *RPT2b* – в меристемах побегов и корней [6]. Таким образом, результаты, полученные нами на модели трансгенных растений табака, в которых ген *uidA* находился под управлением промотора *RPT2a*, совпадают с результатами, полученными на модели трансгенных растений *A. thaliana*.

Согласно суммированным данным, представленным в табл. 1, применение промотора гена *AP3* в сочетании с 5'-НТР ВТМ в гетерологичной системе (в геноме табака) приводит к экспрессии репортерного гена практически во всех элементах цветка и околоцветника, а также в стеблевых и корневых меристемах растений. Промотор гена *RPT2a*, напротив, в гетерологичной системе экспрессии высоко активен только в стеблевых апикальных меристемах, менее активен в корневых меристемах, а в цветке обеспечивает экспрессию репортерного гена только в определенных частях (цветоножка, цветоложе и лепестки).

Таким образом, результаты сравнительного анализа гистохимического GUS-окрашивания тканей цветков двух групп трансгенных растений табака с геном *uidA* под управлением тканеспецифичных промоторов генов *AP3* и *RPT2a* *A. thaliana* показали, что узкая специфичность регуляторных элементов не всегда эффективно сохраняется при их сочетании с альтернативными 5'-НТР и/или переносе в новое генетическое окружение других видов растений. При этом можно предположить, что изменение специфичности промотора, как показано нами на примере промотора *AP3*, может служить расширению возможностей его использования в гетерологичных системах экспрессии, что находит подтверждение и в других исследованиях [21].

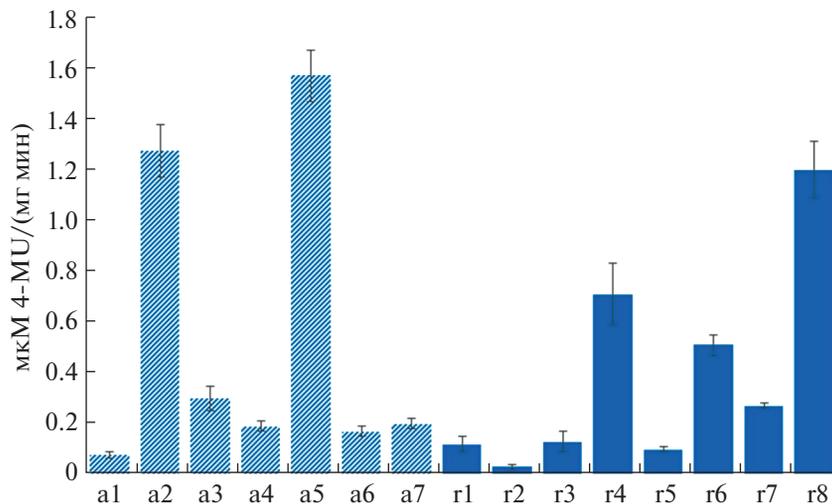
Поскольку оба исследуемых промотора генов *AP3* и *RPT2a* *A. thaliana* были способны сохранять свои функции в геноме трансгенных растений табака, причем активность промотора гена *AP3* проявлялась как эктопическая, представляло ин-

терес провести сравнительный анализ эффективности экспрессии гена *uidA* под управлением этих промоторов в меристемах стебля и корня. Для этого была проведена оценка активности фермента β-глюкуронидазы в меристемах трансгенных растений табака.

**Сравнительный анализ активности β-глюкуронидазы в меристемах трансгенных растений табака.** Результаты сравнительного анализа по активности β-глюкуронидазы в меристемах T<sub>2</sub>-потомков от самоопыления независимо полученных трансгенных растений табака с одной инсерцией гена *uidA* под управлением промоторов генов *AP3* и *RPT2a* представлены на рис. 3.

Как видно на рис. 3, для обеих анализируемых групп растений характерна широкая вариабельность по активности β-глюкуронидазы. В тканях растений табака с геном *uidA* под управлением промотора *AP3* выявлены 20-ти кратные превышения максимальных значений по активности анализируемого фермента ( $1.57 \pm 0.10$  мкМ 4-MU/ (мг мин) для растения а5) над минимальными ( $0.08 \pm 0.01$  для растения а1). Еще более значительные отличия по анализируемому признаку были выявлены для растений табака с геном *uidA* под управлением промотора *RPT2a*. Так, например, максимальное значение активности у растения г8 составило  $1.20 \pm 0.11$ , а минимальное у растения г2 –  $0.03 \pm 0.01$  мкМ 4-MU/ (мг мин), с превышением максимального значения активности фермента по сравнению с минимальным в 40 раз. Согласно критерию Краскела-Уоллиса, для непараметрического сравнения данных по активности фермента между исследуемыми группами растений достоверных отличий ( $H(1; N = 15) = 0.4821442$ ,  $p = 0.4875$ ) не выявлено.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что оба промотора в целом с одинаковой эффективностью обеспечивают наработку транскрипта исследуемого репортерного гена *uidA* и могут быть использованы в качестве регуляторных элементов для экспрессии трансгенов в меристематических тканях растений. Несмотря на эктопический характер экспрессии, промотор гена *AP3* *A. thaliana* с успехом может быть использован при создании генно-инженерных векторов для экспрессии целевых генов в стеблевых и корневых меристемах.



**Рис. 3.** Активность  $\beta$ -глюкуронидазы в меристемах трансгенных растений табака с геном *uidA* под управлением тканеспецифичных промоторов *A. thaliana*. a1–a7 – ген *uidA* под управлением промотора гена *AP3*; r1–r8 – ген *uidA* под управлением промотора гена *RPT2a*.

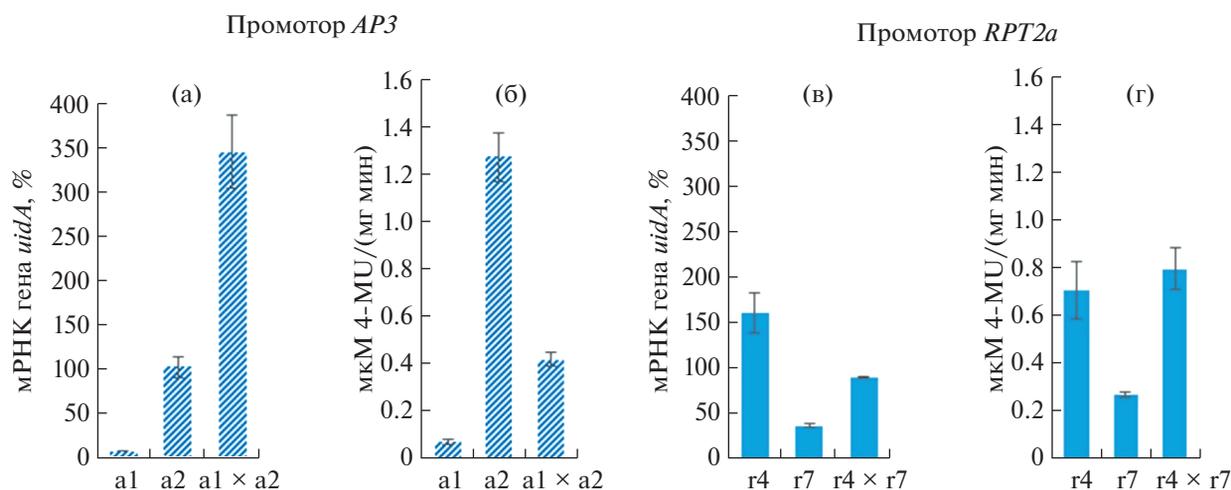
Наблюдаемая вариабельность по активности  $\beta$ -глюкуронидазы у анализируемых трансгенных растений табака может быть связана с различными факторами, в частности, с особенностями организации хроматина в районах встройки T-ДНК, организацией самих инсерций и их копийности. Вариабельность по экспрессии трансгенов, интегрированных в разные районы генома, продемонстрирована во многих работах [22–24]. Достоверное увеличение активности  $\beta$ -глюкуронидазы в тканях трансгенных растений табака при объединении в геноме двух копий гена *uidA* под управлением конститутивного 35S промотора вируса мозаики цветной капусты было показано нами ранее [25]. В связи с этим представляло интерес проанализировать взаимосвязь между активностью фермента  $\beta$ -глюкуронидазы и количеством мРНК, транскрибируемой с *uidA* гена, не только у гомозиготных трансгенных растений, различающихся по активности фермента, но и у гибридов между ними.

**Анализ взаимосвязи активности  $\beta$ -глюкуронидазы с накоплением мРНК в меристемах трансгенных растений табака.** Результаты количественного анализа мРНК, транскрибируемой с *uidA* гена под управлением двух исследуемых тканеспецифичных промоторов, и активности его белкового продукта у независимо полученных трансгенных растений табака, а также гибридов между ними, представлены в табл. 2. Сопоставляя полученные данные, следует отметить отсутствие очевидной прямой взаимосвязи между этими параметрами, то есть ферментативная активность белка GUS не коррелирует с наблюдаемыми флуктуациями по экспрессии соответствующего транскрипта.

В качестве примера на рис. 4 представлены данные сравнительного анализа накопления мРНК гена *uidA* и активности фермента  $\beta$ -глюкуронидазы

в тканях 6-ти недельных трансгенных растений табака, контрастно различающихся по экспрессии репортерного гена, а также в тканях гибридов F<sub>1</sub>, полученных от их скрещивания.

В случае использования промотора *AP3* низкий уровень накопления мРНК в тканях моноинсерционных гомозиготных растений линии a1 ( $7.50 \pm 0.60\%$ ) соответствовал низкой активности фермента ( $0.08 \pm 0.01$  мкМ 4-MU/(мг мин)), в то же время более высокий уровень мРНК у растений a2 ( $102.10 \pm 12.10\%$ ) коррелировал с более высокими значениями ферментативной активности ( $1.27 \pm 0.10$  мкМ 4-MU/(мг мин)). Аналогичная ситуация наблюдалась и в случае использования промотора *RPT2a* (рис. 4). Более низкому значению накопления мРНК ( $37.70 \pm 2.60\%$ ) у растений линии r7 соответствовала и низкая активность фермента ( $0.27 \pm 0.01$  мкМ 4-MU/(мг мин)), а более высокому уровню мРНК ( $161.60 \pm 22.40\%$ ) у растений линии r4 соответствовала более высокая активность фермента ( $0.71 \pm 0.12$  мкМ 4-MU/(мг мин)). Однако при объединении двух независимых инсерций T-ДНК в геноме гибридных растений подобной корреляции между уровнем накопления транскрипта и ферментативной активностью не наблюдалось. Так, у гибридных растений F<sub>1</sub> (a1  $\times$  a2) с промотором гена *AP3* уровень экспрессии *uidA*-гена по накоплению мРНК значительно превысил этот показатель у родительских форм ( $343.20 \pm 41.00\%$ ), в то же время активность  $\beta$ -глюкуронидазы заняла лишь промежуточное положение ( $0.42 \pm 0.03$  мкМ 4-MU/(мг мин)), существенно уступив одной из родительских форм (табл. 2; рис. 4а, б). При объединении двух *uidA* генов под управлением промотора гена *RPT2a* в гибридном геноме (F<sub>1</sub> r4  $\times$  r7) ак-



**Рис. 4.** Сравнительный анализ накопления мРНК гена *uidA* и активности  $\beta$ -глюкуронидазы в трансгенных растениях табака и гибридах  $F_1$  от их скрещивания. (а), (в) – количество мРНК, % от мРНК гена *GSP*; (б), (г) – активность  $\beta$ -глюкуронидазы, мкМ 4-MU/(мг мин). Обозначения: а1, а2 – *uidA* под управлением промотора *ар3*,  $F_1$  (а1  $\times$  а2) – гибрид от скрещивания а1 и а2; г4, г7 – *uidA* под управлением промотора *RPT2a*,  $F_1$  (г4  $\times$  г7) – гибрид от скрещивания г4 и г7.

**Таблица 2.** Характеристика трансгенных растений табака с геном *uidA* по накоплению мРНК и активности  $\beta$ -глюкуронидазы.

Моноинсерционные гомозиготные растения и их гибриды $F_1$	Количество мРНК гена <i>uidA</i> , %	Активность $\beta$ -глюкуронидазы, мкМ 4-MU/(мг мин)
а1	7.5 $\pm$ 0.6	0.08 $\pm$ 0.01
а2	102.1 $\pm$ 12.1	1.27 $\pm$ 0.10
а3	19.8 $\pm$ 4.2	0.30 $\pm$ 0.05
а4	31.2 $\pm$ 4.9	0.19 $\pm$ 0.02
а5	–	1.57 $\pm$ 0.10
а6	–	0.17 $\pm$ 0.02
а7	–	0.20 $\pm$ 0.02
$F_1$ а3 $\times$ а4	58.8 $\pm$ 4.8	0.36 $\pm$ 0.05
$F_1$ а2 $\times$ а4	72.8 $\pm$ 7.0	0.44 $\pm$ 0.03
$F_1$ а2 $\times$ а3	84.8 $\pm$ 8.6	0.31 $\pm$ 0.01
$F_1$ а1 $\times$ а2	343.2 $\pm$ 41.0	0.42 $\pm$ 0.03
$F_1$ а1 $\times$ а4	36.8 $\pm$ 5.9	0.15 $\pm$ 0.03
$F_1$ а1 $\times$ а3	79.9 $\pm$ 6.0	0.25 $\pm$ 0.05
г1	–	0.12 $\pm$ 0.03
г2	–	0.03 $\pm$ 0.01
г3	–	0.13 $\pm$ 0.04
г4	161.6 $\pm$ 22.4	0.71 $\pm$ 0.12
г5	–	0.10 $\pm$ 0.01
г6	–	0.51 $\pm$ 0.04
г7	37.7 $\pm$ 2.6	0.27 $\pm$ 0.01
г8	–	1.20 $\pm$ 0.11
$F_1$ г4 $\times$ г7	90.7 $\pm$ 1.2	0.80 $\pm$ 0.09

тивность  $\beta$ -глюкуронидазы, напротив, незначительно возрастала, превысив показатели родительских форм ( $0.80 \pm 0.09$  мкМ 4-МУ/ (мг мин)), на фоне промежуточных значений ( $90.70 \pm 1.20\%$ ) уровня мРНК (табл. 2; рис. 4в, г).

Поскольку анализируемые трансгенные растения представляли собой потомство  $T_2$  моноинсерционных гомозигот, полученных в результате интеграции единичных инсерций Т-ДНК в случайные районы растительного генома, наблюдаемый позиционный вклад области интеграции Т-ДНК в геном трансгенного растения сопровождался различной транскрипционной активностью трансгенов в составе инсерции [22, 24]. Однако наблюдаемые нами несоответствия между уровнями мРНК и их белковых продуктов свидетельствуют о существовании сложных и все еще мало изученных механизмов декодирования генома. Дальнейшая судьба любого транскрипта может определяться многочисленными регуляторными элементами, скрытыми в их нуклеотидных контекстах [26]. В настоящий момент поиск таких регуляторных элементов и проверка их активности является весьма важной задачей, поскольку позволяет создавать синтетические промоторы, адаптированные под конкретные биоинженерные задачи, а также исследовать тонкие настройки генной экспрессии как на транскрипционном, так и на трансляционном уровнях [4, 26–28].

**Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей тканеспецифичных промоторов генов *AP3* и *RPT2a A. thaliana*.** Важную роль в обеспечении специфичности функционирования промотора любого гена играют цис-регуляторные элементы, представляющие собой короткие нуклеотидные последовательности, входящие в его структуру и обеспечивающие взаимодействие с различными транскрипционными факторами, в том числе и в ответ на воздействие внешних факторов среды [1, 2, 27]. При случайной интеграции Т-ДНК инсерций в различные районы чужеродного генома взаимодействие регуляторных элементов трансгена и транскрипционных факторов в районе интеграции инсерции может изменяться и приводить к эктопической экспрессии. В связи с этим было весьма интересно проверить, какие цис-регуляторные элементы могут входить в состав исследуемых тканеспецифичных промоторов, и могут ли они оказывать какое-либо влияние на особенности экспрессии репортерного гена в новом генетическом контексте генома табака.

Следует отметить, что биоинформатический анализ последовательности промотора гена *AP3* выявил возможность начала транскрипции на 191 нуклеотид ранее, чем было определено экспериментально. При конструировании векторов для экспрессии в растениях за точку начала транскрипции был принят 5'-конец наиболее длинной мРНК гена *AP3 A. thaliana*, существование которой было

показано экспериментально [29]. Поскольку длина 5'-НТР этой мРНК составляла только 36 п.н., было принято решение с целью повышения эффективности трансляции заменить нативный 5'-НТР гена *AP3 A. thaliana* на омега-лидер ВТМ [18].

Биоинформатический анализ позволил выявить в структуре исследуемых промоторов около 20 цис-регуляторных элементов, часть которых были перекрывающимися, то есть обнаруживались в обоих промоторах (табл. 3). Среди перекрывающихся элементов были выделены высококонсервативные элементы корового промотора. К ним относятся ТАТА-боксы, СААТ-мотив (табл. 3). Для промотора *RPT2a* также была выделена последовательность CAN(A/C)(A/C)(C/A)C(C/A)N2A(C/A) сайта инициации транскрипции. Сочетание обнаруженных ТАТА-боксов и сайта инициации транскрипции характерно для промоторов генов растений с высоким уровнем экспрессии [30].

Следует отметить, что большая часть выявленных цис-регуляторных элементов тем или иным образом связана с ответными реакциями на различные стрессовые воздействия (табл. 3). Вполне вероятно, что именно такой тип регуляции характерен для промоторов генов, функционирующих в меристематических тканях, критически ответственных за рост и развитие растений на разных этапах онтогенеза.

Наибольший интерес в данном исследовании представляли мотивы, имеющие гомологию с цис-регуляторными элементами промоторов, описанными для рода *Nicotiana*, поскольку именно они с наибольшей долей вероятности могли влиять на экспрессию репортерного гена *uidA* у полученных трансгенных растений. Анализ последовательностей выявил всего 6 таких регуляторных мотивов, из которых 3 относились к виду *N. glutinosa* L., и 3 – к *N. tabacum* (табл. 3). Последовательность промотора гена *AP3* включала мотивы, гомологичные элементу корового промотора (СААТ-боксы) и элементу ответной реакции на поранение (WUN-motif), характерные для *N. glutinosa*. В последовательности промотора гена *RPT2a* 19S субъединицы 26S протеасомы обнаружили участки, гомологичные AuxRE и TCA элементам, а также TC-rich повторам, отвечающим на действие ауксина, салициловой кислоты и индуцирующим стрессоустойчивость соответственно. В данном промоторе выявился мотив, гомологичный ERE-элементу *N. glutinosa*, отвечающему на воздействие этилена (табл. 3). Функциональность цис-регуляторных элементов, описанных для других неродственных табаку видов, в геноме *N. tabacum* остается под вопросом. Тем не менее, присутствие среди перекрывающихся мотивов элемента Box 4, указывает на участие света в регуляции активности экспрессии исследуемых тканеспецифичных промоторов (табл. 3).

Таблица 3. Регуляторные мотивы, обнаруживаемые в последовательностях тканеспецифичных промоторов генов *AP3* и *RPT2a* *A. thaliana*.

Промоторы	Мотивы	Последовательности	Источник	Описание	
<i>AP3</i> и <i>RPT2a</i>	<b>Перекрывающиеся мотивы</b>				
	CAAT-box	CAACCAACTCC (CCAAT)	<i>A. thaliana</i>	Элемент корового промотора, характерный для генов с высокой экспрессией	
	TATA-box	TATAA (TATA)		Элемент корового промотора	
	STRE	AGGGG		Элемент, участвующий в ответе на стресс	
	MYB	CAACCA		Участвует в регуляции развития растений, метаболизма, старения и защитных реакций	
	MYC	CATTTG		Участвует в ответе на стрессовые факторы: засуха, низкая температура, засоление и АБК	
	Box 4	ATTAAT		Часть консервативного участка ДНК, вовлеченного в ответ на свет	
	ARE	AAACCA		Индукция при анаэробных условиях	
	WRE3	CCACCT		Ответ на поранение	
	<i>AP3</i>	<b>Неперекрывающиеся мотивы</b>			
as-1		TGACG		<i>A. thaliana</i>	Регуляторный цис-элемент, вовлеченный в метилжасмонатный путь передачи сигнала
CGTCA-motif		CGTCA	<i>H. vulgare</i>	Регуляторный цис-элемент, вовлеченный в метилжасмонатный путь передачи сигнала	
CAAT-box		CAAAAT	<i>Nicotiana. glutinosa</i>	Элемент корового промотора, характерный для генов с высокой экспрессией	
WUN-motif		CAATTACAT		Ответ на поранение	
W-box		TTGACC	<i>A. thaliana</i>	Ответ на поранение и элиситоры фитопатогенных грибов	
HD-Zip 1		CAAT(A/T)ATTG		Элемент, вовлеченный в дифференциацию палисадных клеток мезофилла листа	
AuxRE-core		GGTCCAT	<i>N. tabacum</i>	Регуляторный элемент, отвечающий на действие ауксина	
TCA-element		CCATCTTTT		Цис-элемент, участвующий в ответе на салициловую кислоту	
TC-rich repeats		GTTTTCTTAC		Цис-элемент, участвующий в индукции стрессоустойчивости	
ERE		ATTTTAAA	<i>N. glutinosa</i>	Регуляторный элемент, отвечающий на действие этилена	
Circadian		CAAAAGATAC	<i>L. esculentum</i>	Контроль циркадных ритмов	
O2-site		GATGATGTGG	<i>Z. mays</i>	Цис-элемент, участвующий в регуляции метаболизма зеина	
<i>RPT2a</i>					

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные способы модификации организмов основаны на создании искусственных генетических конструкций и их переносе, например, в геномы растений с целью улучшения хозяйственно ценных признаков. Такие экзогенные ДНК методами генной инженерии могут быть интегрированы в случайные районы генома или методами геномного редактирования — в заранее выбранные исследователями районы-мишени. В обоих случаях экспрессия чужеродных генов будет определяться различными факторами, которые могут быть связаны как с особенностями района интеграции, так и особенностями их собственной организации, например, входящими в их состав промоторами. Полученные нами результаты показывают, что оба исследованных промотора *A. thaliana* (*AP3* и *RPT2a*) обеспечивают экспрессию репортерного гена *uidA* в меристемах растений табака примерно с одинаковой эффективностью. Эктопический характер экспрессии, отмеченный для промотора *AP3*, свидетельствует о том, что узкая специфичность не всегда сохраняется в новом генетическом окружении. Однако в определенных условиях такую ситуацию можно рассматривать не как нежелательную, а, наоборот, как расширяющую возможности потенциального использования тканеспецифичных промоторов. Возможной причиной изменения специфичности, а также вариабельности уровня экспрессии переносимых генетических конструкций в условиях случайной интеграции, может служить нарушение взаимодействия соответствующих транскрипционных факторов и цис-регуляторных элементов, закодированных в их промоторных последовательностях. Исследование подобных взаимодействий является важным этапом при создании синтетических промоторов, адаптированных под решение конкретных биотехнологических задач.

Работа поддержана бюджетным проектом 0259-2021-0010 “Изучение систем контроля метаболизма живых систем в условиях взаимодействия с окружающей средой, в том числе после генетической модификации”.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Potenza C., Aleman L., Sengupta-Gopalan Ch. Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation // *In Vitro Cell. Dev. Biol.: Plant*. 2004. V. 40. P. 1.
2. Porto M.S., Pinheiro M.P.N., Batista V.G.L., dos Santos R.C., de Albuquerque Melo Filho P., de Lima L.M. Plant promoters: an approach of structure and function // *Mol. Biotechnol.* 2014. V. 56. P. 38. <https://doi.org/10.1007/s12033-013-9713-1>
3. Ali S., Kim W.-Ch. A fruitful decade using synthetic promoters in the improvement of transgenic plants // *Front. Plant Sci.* 2019. V.10: 1433. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01433>
4. Smirnova O.G., Shumny V.K., Kochetov A.V. Regulatory Sequences for Constitutive, Tissue-Specific, and Induced Expression of Transgenes in Ornamental Plants // *Russ. J. Plant Physiol.* 2019. V. 66. P. 679. <https://doi.org/10.1134/S001533031905018X>
5. Vyacheslavova A.O., Berdichevets I.N., Tyurin A.A., Shimshilashvili Kh.R., Mustafaev O.N., Goldenkova-Pavlova I.V. Expression of heterologous genes in plant systems: new possibilities // *Russ. J. Genet.* 2012. V. 48. P. 1067.
6. Sonoda Y., Sako K., Maki Y., Yamazaki N., Yamamoto H., Ikeda A., Yamaguchi J. Regulation of leaf organ size by the Arabidopsis RPT2a 19S proteasome subunit // *Plant J.* 2009. V. 60. P. 68. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03932.x>
7. Zhang J., Yan G., Wen Z. An Y.-Q., Singer S.D., Liu Z. Two tobacco AP-like gene promoters drive highly specific, tightly regulated and unique expression patterns during floral transition, initiation and development // *Planta*. 2014. V. 239. P. 469. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1995-9>
8. Komakhin R.A., Vysotskii D.A., Shukurov R.R., Voblikova V.D., Komakhina V.V., Strelnikova S.R., Vetchinkina E.M., Babakov A.V. Novel strong promoter of antimicrobial peptides gene pro-SmAMP2 from chickweed (*Stellaria media*) // *BMC Biotechnol.* 2016. V. 16: 43. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0273-x>
9. Krizek B.A., Meyerowitz E.M. The *Arabidopsis* homeotic genes *APETALA3* and *PISTILLATA* are sufficient to provide the B class organ identity function // *Development*. 1996. V. 122. P. 11.
10. Hill Th.A., Day C.D., Zondlo S.C., Thackeray A.G., Irish V.F. Discrete spatial and temporal cis-acting elements regulate transcription of the Arabidopsis floral homeotic gene *APETALA3* // *Development*. 1998. V. 125. P. 1711.
11. Ueda M., Matsui K., Ishiguro S., Sano R., Wada T., Paponov I., Palme K., Okadae K. The HALTED ROOT gene encoding the 26S proteasome subunit RPT2a is essential for the maintenance of Arabidopsis meristems // *Development*. 2004. V. 131. P. 2101. <https://doi.org/10.1242/dev.01096>
12. Сидорчук Ю.В., Герасименко И.М., Шелудько Ю.В., Дейнеко Е.В. Регуляторные элементы для экспрессии трансгенов в меристемах растений // *Вестник Новосибирского государственного аграрного университета*. 2017. Т. 4. С. 66.
13. Koltunow A.M., Truettner J., Cox K.H., Wallroth M., Goldberg R.B. Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development // *The Plant Cell*. 1990. V. 2. P. 1201.
14. Зверева С.Д., Романов Г.А. Репортерные гены для генетической инженерии растений: характеристика и методы тестирования // *Физиология растений*. 2000. Т. 47. С. 479.

15. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal Biochem.* 1976. V. 72. P. 248.
16. O'Maoileidigh D.S., Graciet E., Wellmer F. Gene networks controlling *Arabidopsis thaliana* flower development // *New Phytologist.* 2014. V. 201. P. 16. <https://doi.org/10.1111/nph.12444>
17. Tilly J.J., Allen D.W., Jack T. The CArG boxes in the promoter of the *Arabidopsis* floral organ identity gene *APETALA3* mediate diverse regulatory effects // *Development.* 1998. V. 125. P. 1647.
18. Gallie D.R., Sleat D.E., Watts J.W., Turner Ph.C., Wilson T.M.A. The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts in vitro and in vivo // *Nucleic Acids Res.* 1987. V. 15. P. 3257.
19. Кочетов А.В., Филипенко Е.А., Смирнова О.Г., Шумный В.К. Энкапсуляция транскрипции для генной инженерии растений // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2014. Т. 18. С. 610.
20. Goodrich J., Puangsomlee P., Martin M., Long D., Meyerowitz E.M., Coupland G.A. Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis* // *Nature.* 1997. V. 386. P. 44.
21. Arce A.L., Cabello J.V., Chan R.L. Patents on plant transcription factors // *Recent Patents on Biotechnology.* 2008. V. 2. P. 209. <https://doi.org/10.2174/187220808786241024>
22. Butaye K.M.J., Cammue B.P.A., Delaure S.L., De Bolle M.F.C. Approaches to minimize variation of transgene expression in plants // *Molecular Breeding.* 2005. V. 16. P. 79. <https://doi.org/10.1007/s11032-005-4929-9>
23. Bako A., Gell G., Zámbo A., Spitko T., Pok I., Pinter J., Balázs E. Monitoring transgene expression levels in different genotypes of field grown maize (*Zea mays* L.) // *S. Afr. J. Bot.* 2013. V. 84. P. 6. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2012.09.005>
24. Маренкова Т.В., Сидорчук Ю.В., Носов А.В., Фоменков А.А., Кузнецов В.В., Мурсалимов С.Р., Загорская А.А., Уварова Е.А., Белавин П.А., Дейнеко Е.В. Вариабельность по экспрессии *GFP*-гена в моноклональных клеточных линиях *Arabidopsis thaliana* // *Биотехнология.* 2019. Т. 35. С. 58.
25. Marenkova T.V., Deineko E.V. A change in the stability of marker *nptII* and *uidA* gene expression in transgenic tobacco plants // *Russ. J. Genet.* 2006. V. 42. P. 518.
26. Goldenkova-Pavlova I.V., Pavlenko O.S., Mustafaev O.N., Deineko I.V., Kabardaeva K.V., Tyurin A.A. Computational and experimental tools to monitor the changes in translation efficiency of plant mRNA on a genome-wide scale: advantages, limitations, and solutions // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20: 33. <https://doi.org/10.3390/ijms20010033>
27. Venter M. Synthetic promoters: genetic control through cis engineering // *Trends Plant Sci.* 2007. V. 12. P. 118. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.01.002>
28. Hernandez-Garcia C.M., Finer J.J. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements // *Plant Sci.* 2014. V. 217–218. P. 109. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.12.007>
29. Jack T., Brockman L.L., Meyerowitz E.M. The homeotic gene *apetala3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens // *Cell.* 1992. V. 68. P. 683.
30. Sawant S., Singh P., Gupta S., Madnala R., Tuli R. Conserved nucleotide sequences in highly expressed genes in plants // *J. Genet.* 1999. V. 78. P. 123.

**КОРРЕЛЯЦИЯ СОДЕРЖАНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ  
И ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ  
МОНОДЕГИДРОАСКОРБАТРЕДУКТАЗ (MDHARs)  
У ЛУКА-ПОРЕЯ (*Allium porrum* L.)**

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

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

\*e-mail: michel7753@mail.ru

Поступила в редакцию 10.12.2020 г.

После доработки 04.01.2021 г.

Принята к публикации 13.02.2021 г.

В работе было определено содержание аскорбиновой кислоты и профиль экспрессии генов монодегидроаскорбатредуктаз *MDHAR1*, *MDHAR4* и *MDHAR5* в различных частях растений лука-порея (*Allium porrum* L.), собранных по мере роста (в июле и октябре). В листьях всех анализируемых сортов содержание аскорбата было выше, чем в ложном стебле (в 2.3–3.7 раза в июле и в 2.1–4.1 раза в октябре). Транскрипты *MDHAR* выявлены во всех анализируемых частях лука-порея. Листья и ложный стебель растений лука-порея характеризовались высоким уровнем экспрессии всех трех генов *MDHAR*. Для гена *MDHAR5* во всех частях растения наблюдался сходный уровень транскрипции и в июле, и в октябре. Для гена *MDHAR4* наблюдались два различных профиля экспрессии гена, в зависимости от точки сбора. Было выявлено, что в период формирования ложного стебля у анализируемых сортов лука-порея наблюдаются сходные профили экспрессии генов *MDHAR1* и *MDHAR4*. При этом уровни транскрипции гена *MDHAR4* положительно коррелируют с содержанием аскорбиновой кислоты в белой части и зеленых листьях растений лука-порея.

**Ключевые слова:** *Allium porrum*, гены рециклинга аскорбиновой кислоты, MDHAR, профиль экспрессии

DOI: 10.31857/S0015330321050031

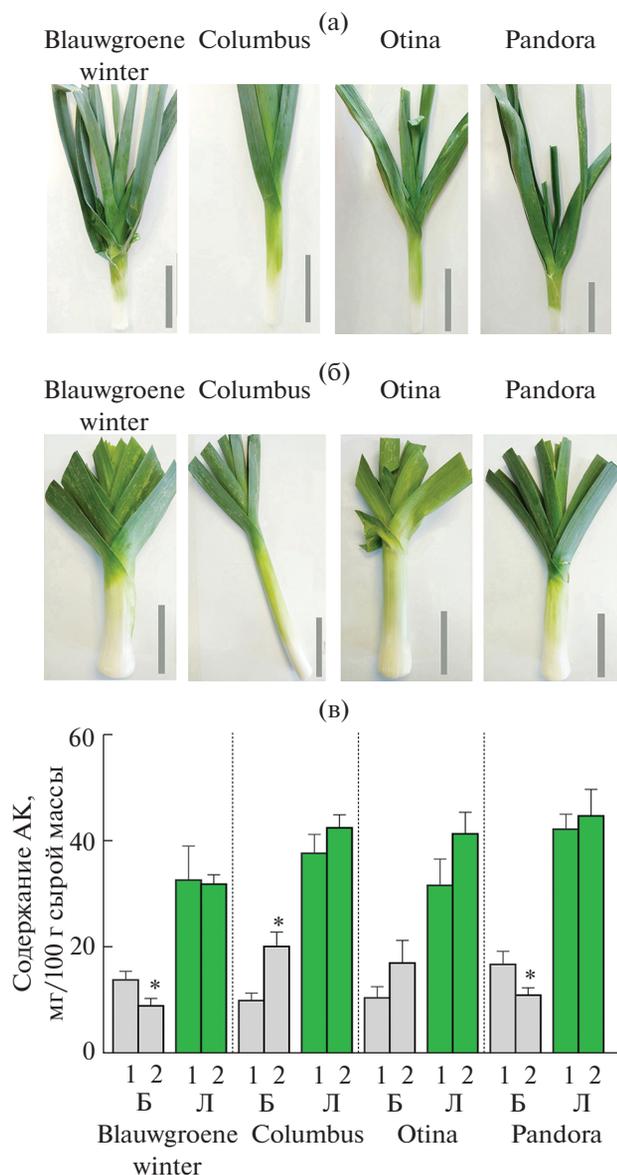
## ВВЕДЕНИЕ

L–аскорбиновая кислота (АК, витамин С) является важным компонентом неферментативной и ферментативной антиоксидантной системы растений [1]. В процессе метаболизма в клетках растений происходит постоянное образование активных форм кислорода (АФК) [2]. Чрезмерное образование и накопление АФК вызывает негативные эффекты – окисление компонентов клеточных мембран и деградацию нуклеиновых кислот, белков и пигментов, что в конечном итоге приводит к гибели клеток [2]. Однако в небольших количествах АФК действуют как сигнальные молекулы, участвуя в процессах роста и деления клеток, а также в ответных реакциях на атаку фитопатогенов [1, 3].

АК обладает способностью нивелировать действие некоторых АФК, напрямую связываясь с ними [4]. Также, АК является субстратом для аскорбатпероксидаз (АРХ; ЕС 1.11.1.11), которые нейтрализуют образующийся в различных клеточных компартментах пероксид водорода [4]. Во

внеклеточном матриксе (апопласт) в нейтрализации АФК задействован фермент аскорбатоксидаза (АО; ЕС 1.10.3.3), предпочтительно использующий АК в качестве донора электронов [5]. В результате реакций неферментативной нейтрализации АФК и деятельности АРХ и АО образуется окисленная форма АК – монодегидроаскорбиновая кислота (MDHA), которая затем может самопроизвольно диспропорционировать с образованием дегидроаскорбиновой кислоты (DHA) и молекулы аскорбата [4].

Образующиеся окисленные формы аскорбата (MDHA и DHA) способны восстанавливаться до АК ферментами монодегидроаскорбатредуктазой (MDHAR; ЕС 1.6.5.4) и дегидроаскорбатредуктазой (DHAR; ЕС 1.8.5.1), соответственно [4, 6]. В качестве донора электронов эти ферменты используют NAD(P)H (MDHAR) и восстановленный глутатион (DHAR). Таким образом, данные ферменты позволяют растениям рециркулировать окисленные формы АК [7]. Восстановление АК посредством MDHAR является энергетически



**Рис. 1.** Растения лука-порея сортов Blauwgroene winter, Columbus, Otina и Pandora, собранные в июле (а) и октябре (б). Масштабная линия соответствует длине 10 см. Содержание аскорбиновой кислоты (в) в белой части (Б) и зеленых листьях (Л) этих растений; 1 – временная точка отбора июль, 2 – временная точка отбора октябрь. Достоверные различия ( $P$ -value  $\leq 0.05$ ) между содержанием АК в однотипных тканях в двух анализируемых точках отбора отмечены звездочкой.

выгодным для растений, так как расходуется всего одна молекула NAD(P)H [8]. Рециклинг АК является частью аскорбат – глутатионового цикла, одного из основных механизмов поддержания внутриклеточного окислительно – восстановительного статуса [9].

В клетках растений присутствует несколько монодегидроаскорбатредуктаз, которые локализируются в различных органеллах – хлоропластах,

митохондриях, пероксисомах и цитозоле [10–13]. Гены *MDHAR* идентифицированы у многих видов растений. Так, в геноме *Arabidopsis thaliana* присутствует пять генов, кодирующих ферменты MDHAR различной клеточной локализации [14]. Геном мха *Physcomitrella patens* содержит три гена *MDHAR* [15]. Гены различных *MDHARs* идентифицированы в геномах гороха *Pisum sativum* [11], пшеницы *Triticum aestivum* [16], клевера *Trifolium repens* [17] и других видов растений. Для некоторых видов растений показано существенное увеличение уровня транскрипции генов *MDHAR* в ответ на абиотические стрессы, что свидетельствует о важной роли MDHAR в реакции растений на окислительный стресс [2, 8, 11, 18].

Лук-порей (*Allium porrum* L.) является популярной овощной культурой в Западной Европе и Азии, а в последнее время и в РФ. В пищу пригодна практически всё растение – белая часть (ложный стебель) и зеленые листья. Известно всего две работы, касающиеся MDHAR представителей рода *Allium* и их взаимосвязи с ответом растений на абиотический стресс [19, 20]. Показано, что в ответ на солевой стресс образцы двух генотипов лука репчатого *A. cepa* реагируют ростом ферментной активности MDHAR в симпласте корня и листа [20]. Также, активность MDHAR была рассмотрена как биомаркер загрязнения воды тяжелыми металлами, поскольку луковичи *A. cepa* при воздействии разных комбинаций тяжелых металлов демонстрируют рост активности MDHAR [19].

В данной работе впервые были определены профили экспрессии трех генов монодегидроаскорбатредуктаз в различных частях растений лука-порея четырех сортов в процессе роста. В сочетании с данными биохимического анализа были выявлены возможные корреляции между содержанием витамина С и уровнями экспрессии генов *MDHAR*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Растительный материал.** В работе были использованы растения лука – порея сортов Blauwgroene winter, Columbus, Otina и Pandora. Семена были предоставлены Федеральным научным центром овощеводства (Московская обл.).

По пять растений каждого сорта были выращены в 2020 году в контролируемых условиях (день/ночь – 16/8 ч, 22/16°C, освещенность 190 мкМ/(м<sup>2</sup> с)) с использованием экспериментальной установки искусственного климата (Институт биоинженерии ФИЦ Биотехнологии РАН). По два растения лука-порея каждого из четырех сортов были собраны в конце июля (на стадии активного роста и формирования ложного стебля) и середине октября (сформирован ложный белый стебель) (рис. 1). Растения анализируемых сортов лука-

порья различались толщиной и длиной ложного стебля: толстый (диаметр 4–6 см) и короткий (13–16 см) у сортов *Blauwgroene winter* и *Pandora*; тонкий (2–3 см) и длинный (20–25 см) у сорта *Columbus*; толстый (4–6 см) и длинный (19–21 см) у сорта *Otina*.

**Определение аскорбиновой кислоты.** Содержание аскорбиновой кислоты определяли с помощью набора “Enzytec™ L-Ascorbic acid” (R-Biopharm AG, Германия) в двух биологических и трех технических повторах.

**Выделение РНК, синтез кДНК.** Суммарную РНК выделяли из корней, донца (видоизмененный стебель), листьев (фрагменты взрослых листьев в 10 см от белой части) и белой части (ложный стебель; поперечный срез диаметром 0.5 см отбеленного ложного стебля в 2 см от донца) растений. Для выделения и очистки РНК от примесей ДНК использовали наборы RNeasy Plant Mini Kit и RNase free DNase set (QIAGEN, Германия). На основе полученных препаратов синтезировали кДНК (набор GoScript™ Reverse Transcription System; Promega, США).

**Идентификация генов MDHAR и разработка праймеров для ПЦР–РВ.** Последовательности генов *MDHAR* идентифицировали в доступных транскриптомных данных (NCBI TSA; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) видов *Allium* (*A. cepa* и *A. sativum*). На основе найденных последовательностей разрабатывали специфичные для каждого гена *MDHAR* видов *Allium* праймеры для проведения ПЦР в реальном времени (ПЦР–РВ).

**Определение профиля экспрессии генов.** Профиль экспрессии идентифицированных генов *MDHARs* определяли методом количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР–РВ) в корнях, донце, зеленых листьях и отбеленной части ложного стебля растений лука – порея. Относительный уровень экспрессии исследуемых генов *MDHARs* оценивали, используя референсные гены *GAPDH* [21] и *UBQ* [22]. Для проведения ПЦР–РВ использовали набор “Реакционная смесь для проведения ПЦР–РВ в присутствии SYBR Green I и ROX” (ООО “Синтол”, Россия) и термоциклер CFX96 Real – Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, USA). 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 статистической обработки результатов использовали программу GraphPad Prism v. 8 (<https://www.graphpad.com>).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

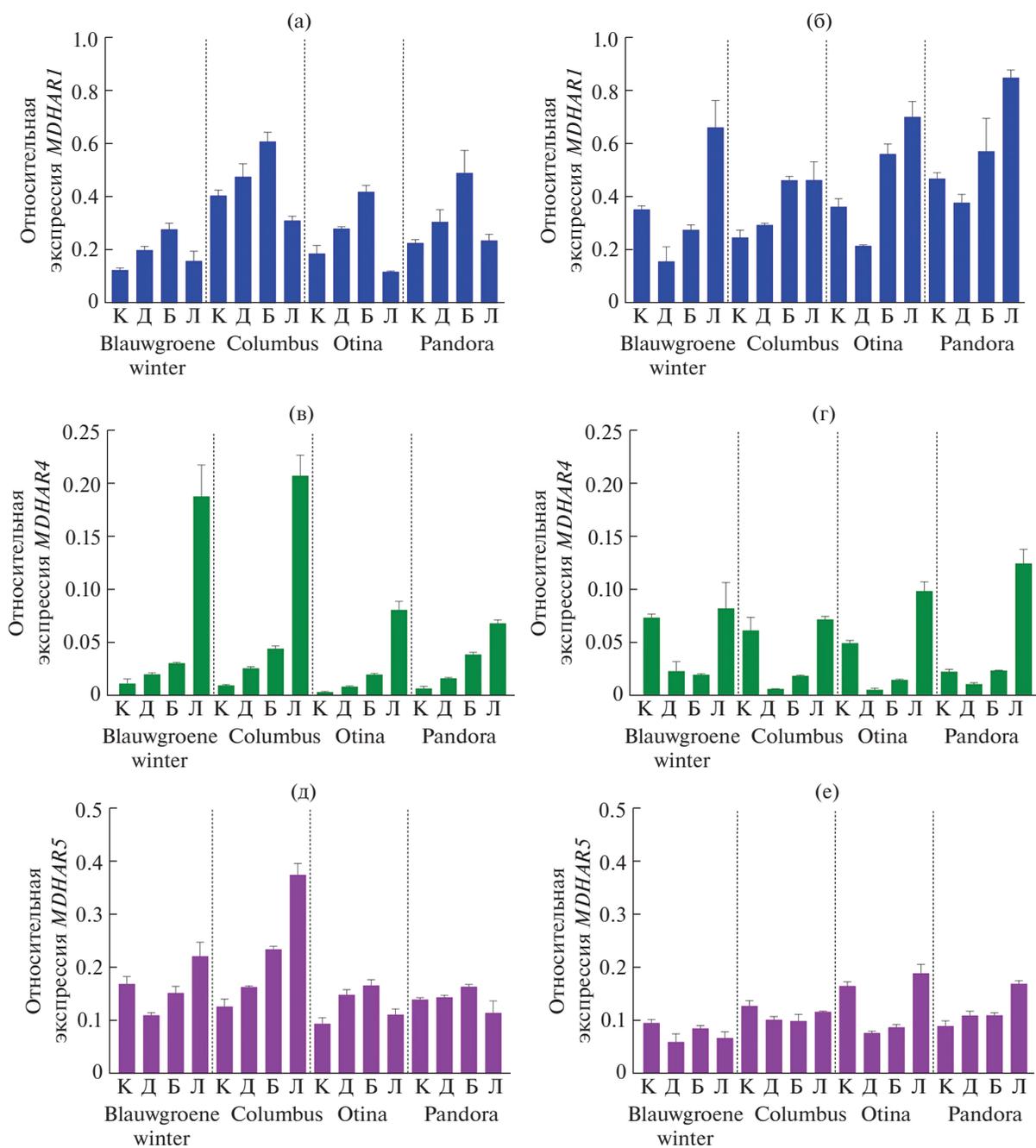
**Содержание аскорбиновой кислоты в листьях и белой части растений лука-порея.** У четырех сортов лука-порея, различающихся морфологией ложного стебля (рис. 1а, б), было определено со-

держание аскорбиновой кислоты в листьях и белой части, в двух временных точках отбора (в июле и октябре) (рис. 1в). У растений, собранных в июле, содержание АК в белой части составило в среднем 10.2 (у сортов *Columbus* и *Otina*), 13.8 (*Blauwgroene winter*) и 16.7 (*Pandora*) мг/100г, а в зеленых листьях ее содержание было в 2.3–3.7 раза выше, максимальное содержание выявлено в листьях сорта *Pandora* (около 42.3 мг/100г). В растениях лука-порея, собранных в октябре, содержание АК в белой части в сравнении со значениями в июле либо не изменялось (сорт *Otina*), либо снижалось (в 1.5 раза у сорта *Blauwgroene winter* и *Pandora*), либо увеличивалось (в 1.9 раза у сорта *Columbus*). В листьях содержание АК было сопоставимо в обеих временных точках, при этом в октябре содержание АК было в 2.1–4.1 раз выше, чем в белой части (рис. 1в).

**Разработка праймеров для экспрессионного анализа генов MDHARs у образцов лука-порея.** Так как у лука-порея и других видов *Allium* последовательности генов монодегидроаскорбатредуктаз к настоящему времени не известны, сначала была проведена идентификация генов *MDHARs* в доступных транскриптомных данных (NCBI TSA) родственных луку-порею видов *A. cepa* (лук репчатый) и *A. sativum* (чеснок). В качестве референсных последовательностей для поиска использовали гены монодегидроаскорбатредуктаз спаржи *Asparagus officinalis* (*AoMDHAR1* (XM\_020404726.1), *AoMDHAR4* (XM\_020395983.1), *AoMDHAR5* (XM\_020385457.1)). В результате проведенного поиска в транскриптомах *A. cepa* и *A. sativum* были найдены транскрипты (GEOY01092914.1, GFAK01049639.1 и GFAK01071117.1 – для *A. cepa*; GFYZ01017298.1, GFAP01048520.1 и GFAP01035120.1 – для *A. sativum*), гомологичные мРНК генов *AoMDHAR1*, *AoMDHAR4* и *AoMDHAR5*. Аминокислотные последовательности MDHAR видов *Allium* и *As. officinalis* были высоко гомологичны (*MDHAR1* – сходство 86.6%, *MDHAR4* – 84.8%, *MDHAR5* – 84.7%). На основе найденных последовательностей трех генов *MDHAR* были разработаны праймеры для проведения экспрессионного анализа у лука-порея (табл. 1).

**Определение профиля экспрессии генов MDHARs в различных органах лука-порея.** Методом ПЦР–РВ был определен профиль экспрессии гомологов генов *MDHAR1*, *MDHAR4* и *MDHAR5* в различных органах растений лука-порея четырех анализируемых сортов на двух стадиях развития растения: в июле (активный рост и формирование ложного стебля) и в октябре (ложный стебель сформирован) (рис. 2).

Экспрессия генов *MDHAR* выявлена во всех анализируемых частях/органах лука-порея (рис. 2). При этом уровни экспрессии гена *MDHAR1* были существенно выше экспрессии двух других генов.



**Рис. 2.** Профиль экспрессии генов *MDHAR1* (а, б), *MDHAR4* (в, г) и *MDHAR5* (д, е) в корнях (К), донце (Д), белой части (Б) и листьях (Л) растений лука – порея сортов Blauwgroene winter, Columbus, Otina и Pandora, собранных в июле (а, в, д) и октябре (б, г, е).

**Таблица 1.** Последовательности праймеров, использованные для проведения ПЦР–РВ.

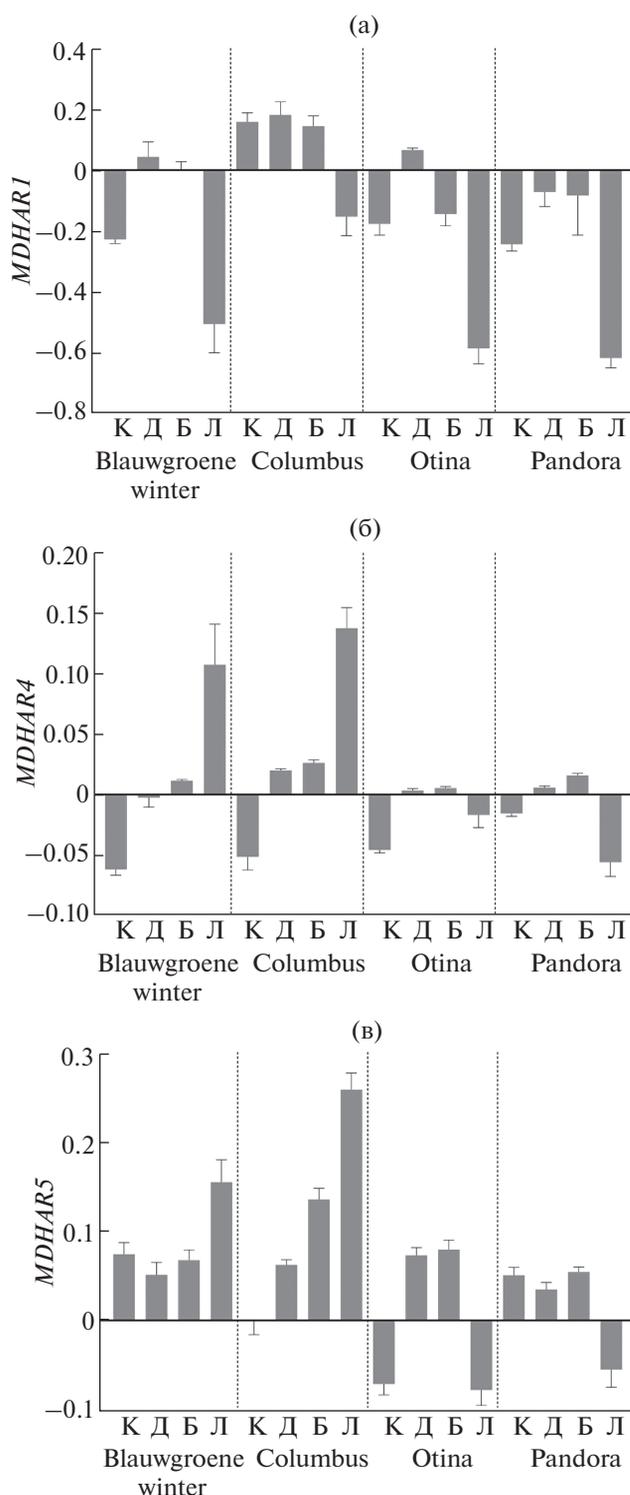
Ген	Последовательности праймеров (5'–3')	Размер ампликона, п.н.
<i>MDHAR1</i>	5'-TTTGAACCCTGGCGAGCTTG-3' 5'-CTGGCAGTAAGCGTTCCTCA-3'	155
<i>MDHAR4</i>	5'-CGCAGGTTATGCAGCTCTTG-3' 5'-CGCCTACGCAAGTATGAAATGC-3'	166
<i>MDHAR5</i>	5'-GGGGCTCGCATAGATAAGTTGA-3' 5'-TCCCACGGACTTATTCAGCC-3'	161

Интересно отметить, что у собранных в июле растений лука-порей наблюдался сходный (между сортами) профиль экспрессии гена *MDHAR1* (рис. 2а). Максимальный уровень транскрипции *MDHAR1* выявлен в белой части растений лука-порей, минимальный – в корнях и/или листьях. У сортов *Blauwgroene winter* и *Pandora* уровни транскрипции *MDHAR1* в корнях и листьях были сопоставимы, а у сортов *Columbus* и *Otina* в корнях уровень экспрессии был выше, чем в листьях, в 1.3 и 1.5 раза, соответственно. В растениях, собранных в октябре, сходный паттерн экспрессии *MDHAR1* наблюдался у сортов *Blauwgroene winter*, *Otina* и *Pandora*: максимальный уровень транскрипции – в листьях, минимальный – в донце. У сорта *Columbus* уровни транскрипции *MDHAR1* были сопоставимы в корнях и донце, в белой части и листьях (рис. 2б).

В сравнении с образцами, собранными в июле, в растениях, собранных в октябре, уровень экспрессии *MDHAR1* вырос во всех анализируемых органах (*Pandora*), в корнях, белой части и листьях (*Otina*), в корнях и листьях (*Blauwgroene winter*), или только в листьях (*Columbus*) (рис. 3а). В белой части растений сорта *Blauwgroene winter* уровень экспрессии *MDHAR1* не изменился (рис. 3а).

Профиль экспрессии гена *MDHAR4* в растениях лука-порей, собранных в июле, был сходным между сортами – минимальный уровень транскрипции в корнях, максимальный – в листьях (рис. 2в). При этом в листьях сортов *Blauwgroene winter* и *Columbus* уровень транскрипции *MDHAR4* был выше в 2.3 – 3.1 раза, чем у сортов *Otina* и *Pandora*. В растениях, собранных в октябре, экспрессия *MDHAR4* в листьях снижалась в 2.4 и 2.9 раза (*Blauwgroene winter* и *Columbus*) или, наоборот, увеличивалась в 1.2 и 1.8 раза (*Otina* и *Pandora*) (рис. 2г, 3б). В корнях в июле наблюдался минимальный уровень транскрипции *MDHAR4* (рис. 2в), а в корнях собранных в октябре в растениях лука-порей уровень транскрипции *MDHAR4* значительно возрастал (в 3.2–12.0 раз) (рис. 2г). В донце уровень транскрипции *MDHAR4* по мере роста растений снижался (*Columbus*, *Otina* и *Pandora*), либо не изменялся (*Blauwgroene winter*), а в белой части растений всех четырех сортов наблюдалось снижение уровня транскрипции гена *MDHAR4* (рис. 3б).

В случае гена *MDHAR5* сходный профиль и сопоставимые уровни экспрессии были выявлены в частях/органах (кроме корней) растений лука-порей сортов *Otina* и *Pandora* (рис. 2д). Донце и белая часть растений, собранных в октябре, характеризовались сходным профилем экспрессии *MDHAR5* у пар сортов *Blauwgroene winter*/*Otina* и *Columbus*/*Pandora* (рис. 2е). В сравнении с июлем транскрипция *MDHAR5* различалась: у сортов *Blauwgroene winter* и *Columbus* (кроме корней)



**Рис. 3.** Разница между уровнями экспрессии генов *MDHAR1* (а), *MDHAR4* (б) и *MDHAR5* (в) в июле и в октябре в органах растений лука – порей сортов *Blauwgroene winter*, *Columbus*, *Otina* и *Pandora* (К – корни, Д – донце, Б – белая часть (ложный стебель), Л – листья). Положительные значения (>0) свидетельствуют о снижении в октябре уровней экспрессии генов *MDHARs*, отрицательные значения (<0) – об увеличении уровней экспрессии генов *MDHARs* в октябре.

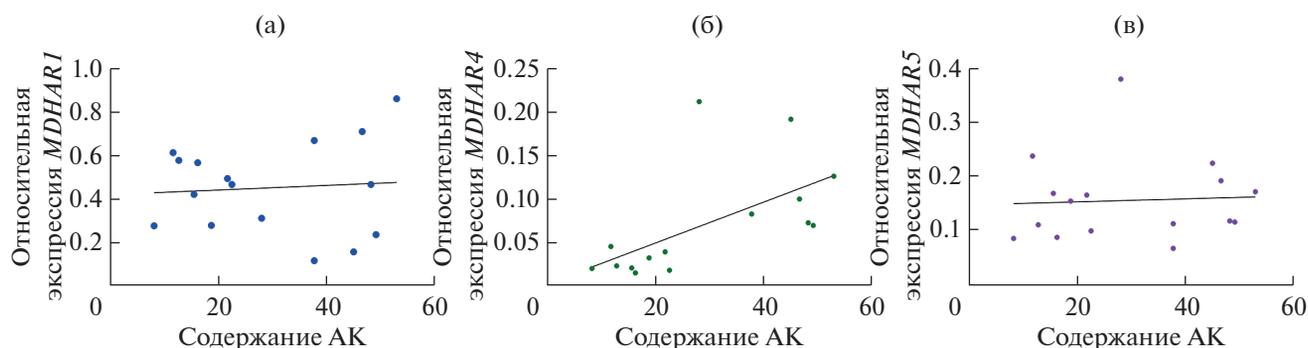


Рис. 4. Линейная регрессия уровней транскрипции генов *MDHAR1* (а), *MDHAR4* (б), *MDHAR5* (в) и содержания аскорбиновой кислоты (мг/100г сырой массы).

происходило снижение уровня транскрипции данного гена, у сорта *Otina* – увеличение в корнях и листьях, а у сорта *Pandora* – рост только в листьях (рис. 3в).

**Взаимосвязь содержания аскорбиновой кислоты с уровнями экспрессии генов *MDHAR* лука – порея.** Полученные значения содержания АК в листьях и белой части были сопоставлены с уровнями транскрипции генов *MDHAR1*, *MDHAR4* и *MDHAR5* лука – порея (рис. 4). Была обнаружена положительная корреляция ( $r = 0.60$ ,  $P$ -value 0.0139) между экспрессией *MDHAR4* и содержанием АК в анализируемых тканях. Корреляции между уровнями транскрипции генов *MDHAR1* и *MDHAR5* и содержанием АК не выявлено ( $r = 0.07$  и 0.05,  $P$ -value > 0.05) (рис. 4).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Рециклинг аскорбиновой кислоты является одним из основных механизмов поддержания внутриклеточного окислительно-восстановительного статуса [9]. Образующиеся при нейтрализации активных форм кислорода окисленные формы аскорбиновой кислоты (MDHA и DHA) способны восстанавливаться обратно до АК под действием монодегидроаскорбатредуктаз (MDHAR) и дегидроаскорбатредуктаз (DHAR) [4, 6].

Проведенный в настоящей работе поиск в транскриптомных данных видов *Allium* последовательностей, гомологичных генам *MDHAR* спаржи *A. officinalis*, позволил разработать праймеры для анализа экспрессии генов *MDHAR1*, *MDHAR4* и *MDHAR5* в частях/органах растения лука-порея *A. porrum*. Высокий уровень гомологии последовательности ферментов MDHAR спаржи и видов *Allium* может свидетельствовать о консервативности их роли в рециклинге АК, в том числе у анализируемых сортов лука – порея.

Подобно другим, известным белкам MDHAR высших растений [10, 12, 15], анализируемые MDHAR лука-порея, предположительно, локализованы в трех компартментах (цитозоле

(MDHAR1), митохондриях (MDHAR5) и пероксисомах (MDHAR4) клетки, осуществляя восстановление АК [6, 7]. Для оценки роли данных белков был проведен анализ экспрессии кодирующих их генов в различных частях растений лука-порея четырех сортов, различающихся морфологией белой части.

Профиль экспрессии генов *MDHAR1*, *MDHAR4* и *MDHAR5* впервые был определен в корнях, донце, белой части и листьях растений лука-порея, собранных в июле (активный рост и формирование белой части) и в октябре (белая часть сформирована) (рис. 2, 3). Впервые было показано, что зеленые (фотосинтезирующие) листья лука-порея в обеих временных точках характеризуются высоким уровнем экспрессии всех трех генов, что может говорить о постоянном окислительном стрессе в процессе роста и взаимодействия с окружающей средой. В белой части лука – порея, структурно являющейся нижней частью листьев, также наблюдались сравнительно высокие уровни экспрессии генов *MDHAR1* и *MDHAR5* (рис. 2), что может свидетельствовать о высоком уровне окислительного стресса в белой части, несмотря на отсутствие фотосинтеза.

Интересно отметить, что ген *MDHAR5*, кодирующий фермент митохондриальной локализации, в обеих точках отбора в целом активен во всех частях растений всех сортов, обеспечивая, возможно, системный ответ на окислительный стресс при дыхании. О системном ответе, вероятно, можно говорить и в отношении цитозольной формы монодегидроаскорбатредуктазы (MDHAR1), хотя наиболее высокие уровни экспрессии гена *MDHAR1* соответствуют белой части и листьям, за исключением сорта *Columbus*, где экспрессия данного гена высокая и в корнях, и в донце. В случае *MDHAR4* для всех сортов мы видим два различных профиля экспрессии гена для июля и для октября. В июле экспрессия *MDHAR4* растет от корней к листьям, что предполагает наибольшую специфичность пероксисомного фермента к фотосинтезирующей ткани. В октябре профиль экспрессии

*MDHAR4* в целом сохраняется, за исключением роста уровня транскрипции данного гена в корнях в 3.5–7.0 раз (рис. 2в, г).

Учитывая функцию монодегидроаскорбатредуктаз, увеличение экспрессии генов *MDHARs* теоретически должно приводить к увеличению содержания АК. В листьях и белой части растений лука-порей было определено содержание аскорбиновой кислоты (рис. 1в). Было выявлено, что растения сортов *Blauwgroene winter* и *Pandora*, формирующие толстый короткий ложный стебель (рис. 1б), имеют сходное содержание АК в белой части и динамику ее изменения в июле – октябре (рис. 1в). У сорта *Columbus*, формирующего длинный тонкий ложный стебель, в октябре содержание АК в белой части увеличилось. У сорта *Otina*, формирующего длинный толстый ложный стебель, содержание АК в белой части достоверно не изменялось. Полученные данные могут свидетельствовать о различиях в ответе растений лука-порей на окислительный стресс в зависимости от сорта.

Интересно, что содержание АК у растений, выращенных в теплице, оказалось ниже, чем у растений тех же сортов, выращенных в полевых условиях и собранных примерно в те же временные точки [23]. Это может свидетельствовать о большем уровне окислительного стресса, испытываемом растениями в постоянно меняющихся условиях окружающей среды и воздействии стрессовых факторов при выращивании в поле. Тем не менее, надо отметить, что соотношение содержания АК в белой части и в листьях у данных сортов в целом сохраняется.

При сопоставлении данных экспрессии генов *MDHARs* и содержания АК стало очевидно, что уровень транскрипции *MDHAR4* положительно коррелирует с количеством АК в белой части и листьях. В зеленых листьях наблюдалось высокое содержание АК и высокий уровень транскрипции *MDHAR4*, тогда как в ложном стебле как содержание АК, так и уровень *MDHAR4* были значительно ниже. Можно предположить, что высокий уровень транскрипции *MDHAR4* (кодирует пероксисомальную форму MDHAR) в зеленых листьях лука-порей связан с активным восстановлением монодегидроаскорбата, образующегося в пероксисомах в результате инактивации АФК [24, 25]. Корреляции между экспрессией генов *MDHAR1* и *MDHAR5* и содержанием АК у лука-порей не выявлено. Интересно, что у томата (*Solanum lycopersicum*) ранее была выявлена обратная зависимость между экспрессией гена цитозольно-пероксисомальной монодегидроаскорбатредуктазы (гомологична *MDHAR1* лука – порей) и содержанием АК в плодах и листьях [13], что также было подтверждено в экспериментах с трансгенными растениями томата – сверхэкспрессия

гена *MDHAR* приводила к значительному снижению содержания аскорбата в плодах [26].

Ранее в растениях этих же сортов лука-порей нами была выявлена положительная корреляция между содержанием АК в зеленых листьях и уровнем транскрипции гена *VTC2* (кодирует ключевой фермент биосинтеза АК) и отрицательная корреляция между этими показателями в белой части растений [23]. Можно было бы предположить обратную зависимость между уровнями транскрипции *VTC2* (синтез АК) и *MDHAR* (рециклинг АК). Однако сравнение уровней экспрессии гена *VTC2* и генов *MDHARs* с учетом содержания АК не выявила между ними каких-либо явных взаимосвязей, что предполагает существование более сложных механизмов регуляции метаболизма АК.

Таким образом, в настоящей работе впервые были определены профили экспрессии генов *MDHAR1*, *MDHAR4* и *MDHAR5* в частях/органах растений четырех сортов *A. porrum*, собранных в двух временных точках (июль и октябрь), проведен их сравнительный анализ. Показано, что период активного формирования ложного стебля у всех анализируемых сортов лука-порей характеризуется аналогичными профилями экспрессии генов *MDHAR1* и *MDHAR4*. На стадии сформированного ложного стебля и проявления морфологических особенностей строения ложного стебля (длина, диаметр), исследуемые сорта демонстрируют различающиеся профили экспрессии генов *MDHARs*, однако для всех четырех сортов выявлен значительный рост уровня транскрипции гена *MDHAR4* в корнях. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что в процессе развития растений лука-порей ответ на окислительный стресс не зависит от сортовых особенностей, в то время как реакция на стресс полностью сформированных растений сортоспецифична. Оценка экспрессии генов *MDHARs* в сопоставлении с результатами биохимического анализа выявили возможные корреляции между уровнем транскрипции *MDHAR4* и содержанием аскорбиновой кислоты в белой части и зеленых листьях растений лука-порей. Существование подобных корреляций может иметь практическое значение для направленной селекции новых сортов лука-порей с повышенным содержанием аскорбиновой кислоты.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2020-907 от 16.11.2020 о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня “Агротехнологии будущего”.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends Plant Sci. 2002. V. 7. P. 405. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02312-9).
2. 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. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
3. Venkatesh J., Park S.W. Role of L-ascorbate in alleviating abiotic stresses in crop plants // Bot Stud. 2014. V. 55. Article 38. <https://doi.org/10.1186/1999-3110-55-38>
4. Smirnoff N. Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals // Free Radical Biology and Medicine. 2018. V. 22. P. 116. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.033>
5. De Tullio M.C., Guether M., Balestrini R. Ascorbate oxidase is the potential conductor of a symphony of signaling pathways // Plant Signal Behav. 2013. V. 8. Article e23213. <https://doi.org/10.4161/psb.23213>
6. Smirnoff N., Wheeler G.L. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function // Crit Rev Biochem Mol Biol. 2000. V. 35. P. 291. <https://doi.org/10.1080/10409230008984166>.
7. Chen Z., Young T.E., Ling J., Chang S.-C., Gallie D.R. Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling // PNAS. 2003. V. 100. P. 3525. <https://doi.org/10.1073/pnas.0635176100>
8. Negi B., Salvi P., Bhatt D., Majee M., Arora S. Molecular cloning, in silico characterization and functional validation of monodehydroascorbate reductase gene in *Eleusine coracana* // PLoS ONE. 2017. V. 12. Article e0187793. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187793>
9. Asada K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions // Plant Physiol. 2006. V. 141. P. 391. <https://doi.org/10.1104/pp.106.082040>
10. Obara K., Sumi K., Fukuda H. The use of multiple transcription starts causes the dual targeting of Arabidopsis putative monodehydroascorbate reductase to both mitochondria and chloroplasts // Plant Cell Physiol. 2002. V. 43. P. 697. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf103>.
11. Leterrier M., Corpas F.J., Barroso J.B., Sandalio L.M., del Río L.A. Peroxisomal monodehydroascorbate reductase, genomic clone characterization and functional analysis under environmental stress conditions // Plant Physiol. 2005. V. 138. P. 2111. <https://doi.org/10.1104/pp.105.066225>
12. Sano S., Tao S., Endo Y., Inaba T., Hossain M.A., Miyake C., Matsuo M., Akoi H., Asada K., Saito K. Purification and cDNA cloning of chloroplastic monodehydroascorbate reductase from spinach // Biosci Biotechnol Biochem. 2005. V. 69. P. 762. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.762>
13. Gest N., Garchery C., Gautier H., Jimenez A., Stevens R. Light-dependent regulation of ascorbate in tomato by a monodehydroascorbate reductase localized in peroxisomes and the cytosol // Plant Biotech J. 2013. V. 11. P. 344. <https://doi.org/10.1111/pbi.12020>.
14. Chew O., Whelan J., Millar A.H. Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in Arabidopsis mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants // J. Biol Chem. 2003. V. 278. P. 46869. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307525200>.
15. Lunde C., Baumann U., Shirley N.J., Drew D.P., Fincher G.B. Gene structure and expression pattern analysis of three monodehydroascorbate reductase (MdhAR) genes in *Physcomitrella patens*: implications for the evolution of the MDHAR family in plants // Plant Mol Biol. 2006. V. 60. P. 259. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-3881-8>
16. Feng H., Liu W., Zhang Q., Wang X., Wang X., Duan X., Li F., Huang L., Kang Z. TaMDHAR4, a monodehydroascorbate reductase gene participates in the interactions between wheat and *Puccinia striiformis* f. sp. tritici // Plant Physiol Biochem. 2014. V. 76. P. 7. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.12.015>
17. Zhang Y., Li Z., Peng Y., Wang X., Peng D., Li Y., He X., Zhang X., Ma X., Huang L., Yan Y. Clones of FeSOD, MDHAR, DHAR genes from white clover and gene expression analysis of ROS-scavenging enzymes during abiotic stress and hormone treatments // Molecules. 2015. V. 20. P. 20939. <https://doi.org/10.3390/molecules201119741>
18. Yoon H.S., Lee H., Lee I.A., Kim K.Y., Jo J. Molecular cloning of the monodehydroascorbate reductase gene from *Brassica campestris* and analysis of its mRNA level in response to oxidative stress // Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Bioenerg. 2004. V. 1658. P. 181. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.05.013>
19. Fatima R.A., Ahmad M. Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater // Sci Total Environ. 2005. V. 346. P. 256. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.12.004>.
20. García G., Clemente-Moreno M.J., Díaz-Vivancos P., García M., Hernández J.A. The apoplastic and symplastic antioxidant system in onion: response to long-term salt stress // Antioxidants (Basel). 2020. V. 12. Article 67. <https://doi.org/10.3390/antiox9010067>.
21. 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>
22. 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>
23. Анисимова О.К., Середин Т.М., Щенникова А.В., Кочиева Е.З., Филюшин М.А. Оценка содержания витамина С и экспрессии гена ГДФ-Л-галактозофосфориллазы (*VTC2*) у сортов лука-порей (*Allium porrum* L.) // Физиология растений. 2021. Т. 68. С. 75. <https://doi.org/10.31857/S0015330320060020>
24. del Río L.A., Corpas F.J., Sandalio L.M., Palma J.M., Gomez M., Barroso J. B. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes // J. Exp. Bot. 2002. V. 53. P. 1255.
25. Lisenbee C.S., Lingard M.J., Trelease R.N. Arabidopsis peroxisomes possess functionally redundant membrane and matrix isoforms of monodehydroascorbate reductase // Plant J. 2005. V. 43. P. 900. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02503.x>.
26. Haraldsen V.M., Chi-Ham C.L., Kulkarni S., Lorence A., Bennett A.B. Constitutively expressed DHAR and MDHAR influence fruit, but not foliar ascorbate levels in tomato // Plant Physiol Biochem. 2011. V. 49. P. 1244. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.08.003>.

## ТЕПЛОВЫЙ СТРЕСС, АГРЕГАЦИЯ ХЛОРОФИЛЛ-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ И СВЕТОЗАВИСИМОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФС II ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

© 2021 г. М. С. Христин<sup>а</sup>, Т. Н. Смолова<sup>а, \*</sup>, В. Д. Креславский<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук, Пушкино, Россия

\*e-mail: smolova\_20@rambler.ru

Поступила в редакцию 22.12.2020 г.

После доработки 15.02.2021 г.

Принята к публикации 17.02.2021 г.

Проведено исследование динамики изменений фотохимической активности фотосистемы II (ФС II) и низкотемпературных спектров при 77 К в первых листьях 11-дневных растений озимой пшеницы *Triticum aestivum* L., а также структурных изменений хлорофилл-белковых комплексов (ХБК) тилакоидных мембран в процессе восстановления после кратковременного (20 мин) прогревания при температуре 42°C. Изменение отношений  $F_v/F_m$ ,  $F735/F695$ ,  $F735/F685$  свидетельствует об ингибировании ФС II сразу после прогревания. С помощью неденатурирующего электрофореза показано, что светособирающий Хл *a/b* комплекс ФС II агрегирует не сразу после прогревания, а через несколько часов, после 6 ч наблюдается дезагрегация ХБК, что согласуется с увеличением отношения  $F_v/F_m$  при восстановлении. Исследовано влияние температуры, интенсивности и качества света (белый, синий и красный свет) на восстановление активности ФС II и низкотемпературных спектров флуоресценции. Сделан вывод, что восстановление является независимым от фотосинтеза светоактивируемым низкоэнергетическим процессом, наиболее эффективным на синем свету.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum*, восстановление фотохимической активности, тепловой стресс, фотосистема II, хлорофилл-белковые комплексы

DOI: 10.31857/S0015330321050079

### ВВЕДЕНИЕ

Обратимое ингибирование фотосинтеза является одним из механизмов адаптации растений к действию многих стрессовых факторов [1], и степень фотоингибирования зависит от баланса между фотоповреждением и механизмом восстановления ФС II [2]. Однако механизмы ингибирования фотосистем и их восстановления в различных стрессовых ситуациях, в частности при кратковременном повышении температуры, исследованы недостаточно. Считается, что восстановление активности фотосинтетического аппарата (ФА), сниженной в результате теплового стресса, зависит от интенсивности и качества света, которые являются одними из определяющих факторов [3–5]. Между тем механизмы действия кратковременного теплового стресса на фотосинтез и пути восстановления фотосинтетической функции после термоинактивации мало изучены. Одним из таких стресс-защитных механизмов ФА от нагревания и фотоингибирования может быть обратимая аг-

регация хлорофилл-белковых комплексов (ХБК) фотосистем, а также денатурация ХБК [6]. Другим механизмом защиты является перераспределение энергии возбуждения между фотосистемами: ССК ФС II из области, где локализована эта фотосистема, может перемещаться в область, где локализована ФС I, благодаря чему энергия, поглощенная ССК, поступает преимущественно в ФС I, которая более устойчива к стрессу, в частности к тепловому [7], чем ФС II [8]. В повышении устойчивости к тепловому стрессу также могут быть важны низкомолекулярные соединения, такие как пролин, глицинбетаин, а также холин-содержащие соединения [9, 10].

При этом одновременное исследование динамики изменений фотохимической активности хлоропластов листа и структурных изменений ХБК тилакоидных мембран ранее не проводилось. Между тем изучение этой динамики могло бы помочь установить связь фотохимических изменений хлоропластов со структурными изменениями ХБК фотосистем.

Целью исследования было изучение влияния кратковременного теплового стресса при 42°C

**Сокращения:** КВК – кислородвыделяющий комплекс, ФА – фотосинтетический аппарат, Хл – хлорофилл.

(20 мин) на динамику светозависимого восстановления фотохимической активности ФС II, сопряженной с восстановлением электрофоретической подвижности ХБК. Мы предполагаем, что обратимые структурно-функциональные изменения ХБК фотосистем являются защитным механизмом для диссипации избыточной энергии возбуждения вследствие ингибирования при термоинактивации системы ассимиляции  $\text{CO}_2$  и/или кислород-выделяющего комплекса (КВК) ФС II.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использовали 11-дневные проростки озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 35, которые выращивали на песке с добавлением раствора Кнопа при интенсивности света  $I = 150$  мкмоль квантов ФАР/( $\text{м}^2$  с), полученного от ламп ДРЛФ400 с фотопериодом 16 ч, при температуре 22°C. Для опытов отбирали одинаковые по размерам растения и помещали проростки в водяной термостат MLW U2 (VEB MLW PRUFGERATE WERK MEDINGEN, DDR) при температуре 42°C (20 мин), полностью погружая проростки в воду. Затем проростки помещали в питательный раствор Кнопа и выдерживали при таких же условиях, какими они были до прогревания, но при разных интенсивностях света (слабой – 60  $\mu\text{E}/(\text{м}^2$  с), умеренной – 300  $\mu\text{E}/(\text{м}^2$  с), сильной – 800  $\mu\text{E}/(\text{м}^2$  с)) при 22°C. Вместе с этим при восстановлении использовали три варианта освещения с помощью белых, красных и синих светодиодов (“TH NEON Ltd.”, Россия), характеристики которых были верифицированы с помощью широкодиапазонного спектрометра S100 (“Solar Laser Systems”, Беларусь). Максимумы полос излучения синих светодиодов – 463 нм, красных – 656 нм, полуширина полос – около 20 нм. В ряде экспериментов в питательную смесь был добавлен хлорамфеникол в конечной концентрации 0.001 М.

Активность ФС II измеряли в первых листьях проростков с помощью метода переменной флуоресценции, используя фосфороскоп [11]. Флуоресценцию возбуждали синим светом с  $\lambda_m = 480$  нм (0.15 Вт /  $\text{м}^2$ ), который был сфокусирован на площадке  $5 \times 20$  мм в верхней трети поверхности листа. Действующий свет (100 Вт/ $\text{м}^2$ ,  $\lambda > 660$  нм) пропускаться через стеклянный светофильтр КС18 (“ЛОМО”, Россия). Измеряемые параметры были  $F_0$ ,  $F_v$ ,  $F_m$ ,  $F_0$  и  $F_m$  – уровни начальной и максимальной флуоресценции Хл *a* соответственно [12],  $F_m$  – свето-индуцированные изменения флуоресценции Хл *a*. Рассчитывался максимальный квантовый выход ФС II – отношение  $F_v/F_m$ .

Структурные изменения ХБК комплексов анализировали с помощью измерения спектров низкотемпературной флуоресценции при возбуждении светом  $\lambda_m = 435$  нм и возбуждения флуорес-

ценции листьев ( $\lambda_m = 685$  нм) при 77 К на спектрофлуориметре Hitachi-850 (Hitachi Ltd., Япония). Высечки листьев помещали в стеклянные трубки, а затем в сосуд Дьюара с жидким азотом, который устанавливали в камере измерения флуориметра. Количество измерений в каждом опыте было не менее трех. При этом находили оптимальное направление возбуждающего света ( $\lambda_m = 435$  нм), падающего на поверхность листа, чтобы рассеяние падающего света было минимальным.

Хлоропласты и частицы ФС II получали по методу [13]. К выделенным частицам ФС II (концентрация Хл = 2 мг / мл в 50 мМ Mes-буфере (pH 6.0) с 10% (w/v) глицерина и 1 М сахарозы) добавляли водный раствор *n*-додецил- $\beta$ -D-мальтозида (ДМ) (10%) при соотношении ДМ/Хл равном 10 : 1 (w/w) и инкубировали при 4°C в течение 45 мин, после чего добавляли 3 объема 50 мМ Mes-буфера (pH 6.5) и центрифугировали при 28000 g 20 мин при 4°C. Супернатант с концентрацией Хл = 15 мкг/мл использовали для электрофореза. При этих условиях в супернатанте находится преимущественно ФС II с малой примесью ССК ФС II.

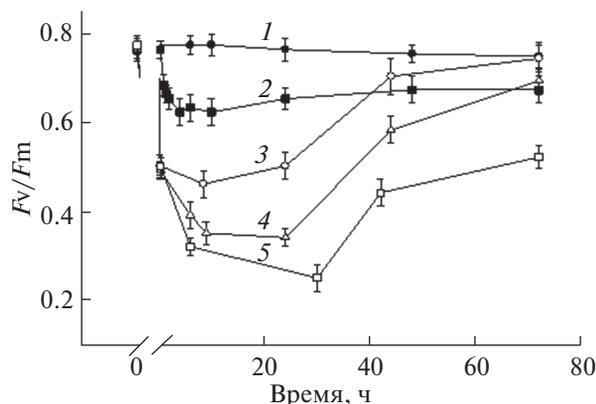
Для неденатурирующего полиакриламидного гель-электрофореза (PAGE) ХБК солибилизовали из мембран тилакоидов. Для этого мембраны (15 мкг/мл Хл) смешивали с раствором 0.45% (ДМ), 0.1% додецилсульфат лития (ЛДС), 10% глицерин в 25 мМ Mes-буфере, pH 6.5 при соотношении детергент/хлорофилл равном 20 : 1 (w/w). После инкубации 30 мин на льду образцы центрифугировали при 45000 g, 20 мин. Для анализа использовали супернатант.

Содержание димеров, мономеров ФС II и агрегатов ССК в тилакоидных мембранах контролировали, используя метод электрофореза в полиакриламидном геле согласно [14] с Дерифатом-160 ( $\beta$ , $\alpha$ -laurel D-iminopropiodinate) в 12%-ном PAGE в цилиндрических трубках. Электрофорез проводили при 85 В в темноте при 4°C.

Для определения флуоресцентных параметров ( $F_v$ ,  $F_m$ ,  $F_0$ ), а также низкотемпературной спектроскопии и содержания пигментов использовали не менее 10 листьев в каждом эксперименте. Все анализы повторялись от 3 до 7 раз. Достоверность экспериментальных данных оценивалась с использованием критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Активность ФС II.** Кратковременное прогревание проростков при 42°C сопровождалось заметным падением максимального квантового выхода флуоресценции  $F_v/F_m$ , характеризующим фотохимическую активность ФС II, с величины 0.75–0.77 (контроль) до 0.50–0.55 (в опыте сразу после обработки) (рис. 1). Однако при этом величина постоянной флуоресценции Хл *a* ( $F_0$ ) практиче-



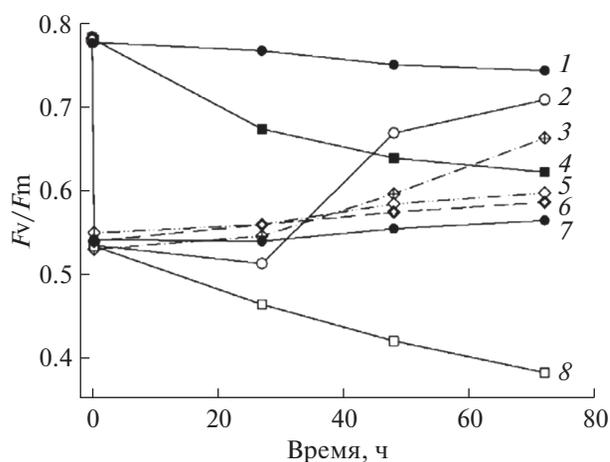
**Рис. 1.** Изменения максимального квантового выхода ФС II ( $F_v/F_m$ ) в листьях 11-дневных проростков озимой пшеницы, подвергнутых (белые символы) и не подвергнутых (черные символы) тепловому стрессу при 42°C (20 мин). После прогревания проростки выращивали на слабом, умеренном и сильном свете при 22°C ( $n = 10$ ). 1 – контроль, слабый свет; 2 – контроль, сильный свет; 3 – прогрев, слабый свет; 4 – прогрев, умеренный свет; 5 – прогрев, сильный свет.

ски не изменялась. При последующем выдерживании термоинактивированных проростков на свету наблюдается дальнейшее снижение отношения  $F_v/F_m$ . Причем, если проростки инкубировать в темноте, то это снижение происходит более длительное время (рис. 2). На белом свете снижение активности продолжалось примерно в течение 10–24 ч, затем наблюдалась некоторая стабилизация и постепенное восстановление. Выдерживание проростков в термостате при комнатной температуре (20 мин) практически не влияет на величину максимального квантового выхода.

Восстановление активности ФС II и электрофоретической подвижности ХБК зависели от интенсивности и спектрального качества света, при которых выдерживались проростки. При одинаковой интенсивности освещения синий свет был наиболее эффективен для восстановления по сравнению с белым и красным светом (рис. 2). Преимущество синего света, по-видимому, связано с активацией синтеза белков, участвующих в восстановлении ФС II. В темновых условиях восстановление практически не наблюдалось. Ингибитор белкового синтеза хлорамфеникол (0.001 М) подавлял восстановление ФА (рис. 2).

Было показано, что предварительное прогревание проростков при 40°C в течение 20 мин приводит к некоторому увеличению первичной теплоустойчивости, а также к заметному усилению скорости репарации КВК и ФС II после вторичного теплового шока (рис. 3).

В спектрах низкотемпературной флуоресценции контрольных и опытных растений наблюдались три полосы с максимумами при 685, 695 и



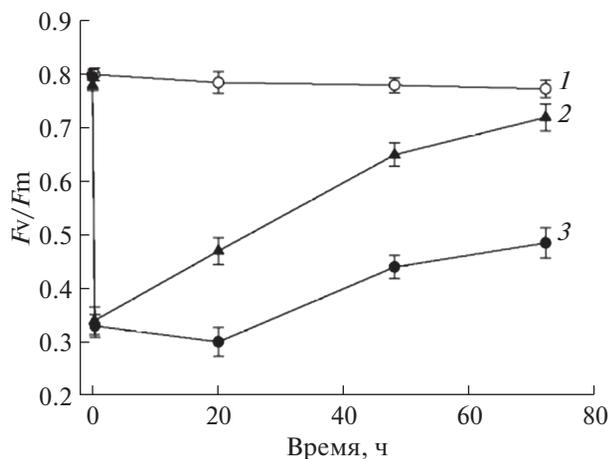
**Рис. 2.** Изменения максимального квантового выхода ФС II ( $F_v/F_m$ ) при нагревании проростков пшеницы при 42°C в течение 20 мин в темноте и при их последующем постстрессовом восстановлении в различных световых условиях: (1) проростки, не подвергнутые нагреванию (контроль); (2) белый светодиодный свет интенсивностью 100 мкмоль квантов/( $m^2$  с); белый (5), синий (3) и красный (6) светодиодный свет интенсивностью 8 мкмоль квантов/( $m^2$  с); (7) без света; (8) ХА + нагревание и восстановление при 100 мкмоль квантов/( $m^2$  с). Показаны средние величины из 3 независимых опытов со стандартной ошибкой.

735 нм. Как известно, две первые полосы отражают состояние хлорофилла в ХБК ФС II [15]. Максимум при 735 нм соответствует ХБК ФС I. Амплитуда максимумов 685 и 695 нм заметно изменялась сразу после прогревания, что приводило к возрастанию отношений  $F_{735}/F_{695}$  и  $F_{735}/F_{685}$  нм (табл. 1). Через 6 ч эти соотношения восстанавли-

**Таблица 1.** Изменения отношений  $F_{735}/F_{695}$  и  $F_{735}/F_{685}$ , рассчитанных из низкотемпературных спектров флуоресценции при 77 К при нагревании (42°C, 20 мин) и последующем восстановлении проростков пшеницы на свету.

Время, ч	$F_{735}/F_{695}$	$F_{735}/F_{685}$
0 (контроль)	$4.0 \pm 0.15$	$4.1 \pm 0.1$
48 (контроль)	$4.1 \pm 0.3$	$4.3 \pm 0.2$
0	$5.5 \pm 0.25$	$4.8 \pm 0.15$
6	$3.6 \pm 0.15$	$3.4 \pm 0.25$
48	$3.9 \pm 0.2$	$3.9 \pm 0.2$

Примечание. Часть проростков выращивали в течение 48 ч при +20°C, не подвергая каким-либо обработкам (контроль), другую часть подвергали термоинактивации при 42°C, затем восстанавливали после тепловой обработки в течение 6 и 48 ч на белом свете ( $I = 60$  мкмоль квантов/( $m^2$  с)). Спектры флуоресценции листовых сегментов регистрировали на длинах волн 685, 695 и 735 нм при  $\lambda_{возб} = 435$  нм сразу после термоинактивации (0), через 6 ч (6) и 48 ч (48) после теплового стресса. Каждая величина соответствует среднему из 5–7 измерений. Различия между контрольными и подвергнутыми тепловому стрессу проростками, кроме строки 0 не достоверны ( $P > 0.01$ ).



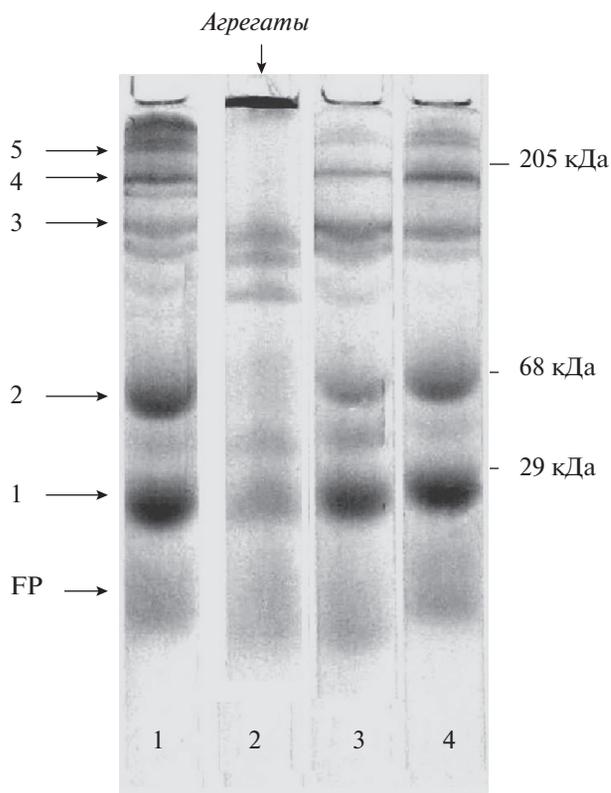
**Рис. 3.** Влияние предобработки при 40°C на восстановление активности ФС II ( $F_v/F_m$ ) проростков пшеницы, подвергнутых в течение 20 мин тепловому шоку при 43°C: (1) необработанные растения (контроль); (2) после предобработки при 40°C часть растений инкубировали 24 ч на белом светодиоидном свете ( $I = 40$   $\mu\text{моль квантов}/(\text{м}^2 \text{с})$ ), затем подвергали тепловому шоку (20 мин, 43°C) и инкубировали на свету (20  $\mu\text{моль квантов}/(\text{м}^2 \text{с})$ ), (3) другую часть растений не предобрабатывали и сразу подвергали тепловому шоку при 43°C. Показаны средние величины из 5 независимых опытов со стандартной ошибкой.

вались до исходного уровня на свету низкой интенсивности. Такие изменения могут повлиять и на результаты разделения ХБК в условиях неденатурирующего электрофореза.

**Анализ на основе полиакриламидного гель-электрофореза.** Метод неденатурирующего электрофореза позволяет сохранять связи белок-хлорофилл и тем самым исследовать субкомплексы ФС II при тепловом стрессе и последующем восстановлении активности ФС II.

На рис. 4 показаны результаты электрофоретического разделения препаратов тилакоидных мембран, выделенных из листьев контрольных непрогретых проростков (дорожка 1), прогретых при 42°C (дорожка 2) и затем восстановленных через 6 ч (дорожка 3) и 24 ч (дорожка 4) проростков.

Обнаружено 5 основных пигментированных фракций (полос), а также свободный хлорофилл. Эти фракции представлены мономером (1), димером (2) и тримером (4) ССК ФС II, ПБК ФС I (3), а также димером корового комплекса ФС II (5). Сразу после прогревания интенсивность полос 2, 4 и 5 уменьшалась и через 6 ч экспозиции на относительно сильном свету (1500  $\mu\text{моль квантов}/(\text{м}^2 \text{с})$ ) падала до минимума. При этом наблюдалось появление полосы на старте дорожки 2, которая, как мы предполагаем, принадлежит к агрегатам ХБК. Эта полоса агрегата исчезала через 24 ч после прогревания и не появлялась при освещении прогре-



**Рис. 4.** Гель-электрофорез ХБК мембран, выделенных из листьев проростков пшеницы непрогретых (1) и прогретых при 42°C (20 мин), затем использованных для анализа после освещения ( $I = 300$   $\mu\text{Е}/(\text{м}^2 \text{с})$ ) в течение 0 ч (2), 6 ч (3) и 24 ч (4). Для загрузки электрофорезных трубок была использована суспензия с концентрацией Хл = 25  $\mu\text{кг}/\text{гель}$ . Используются маркеры определенного молекулярного веса: миозин, 205 кДа; бычий сывороточный альбумин, 68 кДа; карбоангидраза, 29 кДа. Стрелками показаны (1) мономер, (2) димер и (4) тример ССК ФС II, (3) комплекс ФС I, (5) димер корового комплекса ФС II, (FP) свободные пигменты.

тых проростков на свету низкой интенсивности (40  $\mu\text{кМ квантов}/(\text{м}^2 \text{с})$ ) (данные не показаны).

## ОБСУЖДЕНИЕ

ФС II является одним из самых чувствительных компонентов ФА при действии стрессовых факторов, в частности повышенных температур [8, 16]. Особенно чувствительна к нагреванию система выделения кислорода, например, по данным Thompson с соавт. [17] тепловая инактивация системы выделения  $\text{O}_2$  осуществляется при достаточно низких температурах – 30–40°C.

Наиболее вероятно, что тепловой стресс действует на донорную сторону ФС II [16, 18], стимулируя освобождение белка PsbO из марганецсодержащего кластера, а затем ионов марганца, что приводит к снижению флуоресценции Хл [19].

Эти процессы проявляются достаточно быстро и при этом не происходит окислительное повреждение. Отсутствие изменений основной флуоресценции  $F_0$  и содержания Хл в листьях, обнаруженных нами при исследованных температурах, согласуется с обратимостью ингибирования активности ФС II. Однако при достаточно высокой температуре  $F_0$  возрастает, что интерпретируется как результат отделения ССК II от коровых комплексов ФС II [20].

Нами обнаружено, что эффект ингибирования активности ФС II и фотосинтеза усиливается со временем при выдерживании проростков на достаточно сильном свете и выражен тем сильнее, чем выше интенсивность света, при которой выдерживаются проростки (рис. 1). Можно предположить, что после теплового стресса в диапазоне температур 40–42°C фотоингибирование происходит даже при относительно низких интенсивностях света и для восстановления активности КВК и ФС II после ингибирования важны протеолиз поврежденных и синтез новых белков фотосистем.

Известно, что ХБК СР43 и СР47 играют важную роль в поддержании структурной целостности ФС II и ее способности к выделению кислоты [21]. Изолированные комплексы СР43 и СР47 обычно характеризуются полосами испускания низкотемпературной флуоресценции при 77 К с максимумами при 685 и 695 нм ( $F_{685}$  и  $F_{695}$ ) соответственно [15]. Приблизительно такие же максимумы обнаруживаются и при регистрации флуоресценции нативных листьев [22]. Ранее в наших опытах на листьях пшеницы [4] были обнаружены 3 полосы флуоресценции: длинноволновая полоса, связанная с ФС I, и полосы с максимумами около 695 и 685 нм, которые принадлежат ФС II. Заметное снижение интенсивности полос с максимумами 685 и 695 нм наблюдалось сразу после нагревания при 42°C (табл. 1). Так как содержание пигментов после нагревания изменялось мало, мы предполагаем, что эти снижения связаны с перераспределением энергии возбуждения от ФС II к ФС I за счет передвижения ССК ФС II в стромальную область. Это обратимый процесс и можно предположить, что не более чем через 6 ч после теплового стресса восстанавливается прежнее распределение энергии от ССК на ФС II. Динамика изменения электрофоретической подвижности зеленых зон зависела от интенсивности света, используемого для восстановления. На сильном свете через 6 ч содержание ХБК комплексов снижалось (рис. 4), а интенсивная полоса, обнаруженная на старте дорожки 2, связанная с агрегацией высокомолекулярных ХБК, исчезала. Эти факты могут объясняться модификацией белков и ХБК ФС II, прежде всего ССК ФС II, в условиях сильного фотоингибирования. Увеличение отношений  $F_{735}/F_{695}$  и  $F_{735}/F_{685}$  может также

свидетельствовать о перераспределении поглощенной энергии в пользу ФС I. Такой защитный эффект против фотоингибирования и теплового стресса описан в литературе и может быть связан с агрегацией ССК ФС II с частью белков корового комплекса ФС II [6, 22].

Было показано [23], что потеря кислородвыделяющей функции предшествует изменениям структуры комплекса и диссоциации внешних Хл-белков корового комплекса, например, СР43 и СР47, а также других комплексов с последующим их протеолизом. Этот вопрос был изучен в наших экспериментах по динамике изменений пигмент-белковых и субмолекулярных комплексов ФС II. Факт постстрессового снижения фотохимической активности ФС II с лаг-периодом, длящимся несколько часов, может свидетельствовать в пользу предположения о запуске эндогенных механизмов деградации белков ФС II. Возможно, тепловой стресс приводит к освобождению из лизосом протеолитических ферментов, либо активируются пептидазы, локализованные в люмене тилакоидов. В то же время, вероятно, происходит и запуск механизмов, восстанавливающих биосинтез белков ФС II и их включение в поврежденные комплексы. То, что синтез хлоропластных белков *de novo* хотя бы частично необходим для восстановления активности ФС II следует из наших данных по отсутствию заметного восстановления активности ФС II в присутствии ингибитора синтеза белка хлорамфеникола и максимальному восстановительному эффекту синего света (рис. 2).

Нами также изучен эффект температурного закаливания, который важен для восстановления фотохимической активности ФС II. Было показано, что предварительное нагревание проростков при 40°C в течение 20 мин приводит к последующему увеличению первичной термо- и фоторезистентности, а также к усилению скорости репарации КВК и ФС II после вторичного теплового шока (рис. 3). Эти результаты позволяют предположить, что в восстановлении, как после температурного шока, так и при фотоингибировании могут участвовать белки теплового шока.

Известно, что синий свет индуцирует биосинтез белка и увеличение содержания хлорофилла в растениях [24]. Кроме того, опыты с мутантами растений с дефицитом фототропинов и выращивание растений при разном соотношении красного и синего света показали положительное действие синего света, который поглощается криптохромами и фототропинами. Он оптимизирует фотосинтез, стимулируя эффективность поглощения света, уменьшая фотоповреждения и регулируя газообмен между листьями и атмосферой, в частности, увеличивая фотохимическую активность ФС II ( $F_v/F_m$ ) [25, 26]. Предполагается, что эти эффекты есть следствие оптимального расположения хло-

ропластов при освещении листьев синим светом и оптимизации функционирования устьиц на поверхности листа, что важно для увеличения скорости поглощения CO<sub>2</sub>. Это согласуется с высокой эффективностью восстановления ФС II, обнаруженной нами на синем свете. Мы также обнаружили, что в присутствии ингибитора белкового синтеза хлорамфеникола восстановление не происходит. Поэтому, мы предполагаем, что для восстановления ФС II в процессе фотоингибирования важен синтез белков фотосистем, а также эффективный протеолиз поврежденных стрессом белков [4].

Ранее было показано [16], что высокая температура лимитирует способность растений использовать световую энергию и усиливает эффект фотоингибирования. По-видимому, этот эффект проявляется и при послестрессовом восстановлении ФС II, так как на сильном свете восстановление ФС II было существенно замедлено по сравнению с восстановлением на свете низкой интенсивности (рис. 1).

Таким образом, прогревание проростков пшеницы в течение 20 мин при 42°C и последующее выдерживание на свете высокой интенсивности стимулирует агрегацию ССК ФС II, а также мономеров и димеров ФС II. Эти изменения коррелируют со снижением активности ФС II, которая, на достаточно сильном свете, вероятно, обусловлена структурными перестройками и модификацией ХБК. Можно также предположить, что агрегация и структурно-функциональные изменения ХБК фотосистем являются защитными механизмами, увеличивающими диссипацию избыточной энергии возбуждения.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Adir N., Zer H., Shochat S. Ohad I.* Photoinhibition – a historical perspective // *Photosynth. Res.* 2003. V. 76. P. 343.
2. *Demmig-Adams B., Cohu C.M., Muller O., Adams W.W. III.* Modulation of photosynthetic energy conversion efficiency in nature: from seconds to seasons // *Photosynth. Res.* 2012. V.113. P. 75.
3. *Христин М.С., Креславский В.Д., Хоробрых А.А.* Восстановление фотосистемы 2 после кратковременного прогревания листьев пшеницы // *Вестник Башкирского университета.* 2001. Т. 2. С. 84.
4. *Kreslavski V.D., Khristin M.S.* Aftereffect of heat shock on fluorescence induction and low-temperature fluorescence spectra of wheat leaves // *Biophysics.* 2003. V. 48. P. 806.
5. *Kadir S., Von Weihe M.* Photochemical efficiency and recovery of photosystem II in grapes after exposure to sudden and gradual heat stress // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 2007. V. 132. P. 751.
6. *Tang Y., Wen X., Lu O., Yang Z., Cheng Z., Lu C.* Heat Stress Induces an Aggregation of the Light-Harvesting Complex of Photosystem II in Spinach Plants // *Plant Physiol.* 2007. V. 143. P. 629.
7. *Havaux M.* Short-term responses to photosystem I to heat stress // *Photosynth. Res.* 1996. V. 47. P. 85.
8. *Schrader S.M., Wise R.R., Wacholtz W.F., Ort D.R., Sharkey T.D.* Thylakoid membrane responses to moderately high leaf temperature in Pima cotton // *Plant Cell Environ.* 2004. V. 27. P. 725.
9. *Allakhverdiev S.I., Los D.A., Mohanty P., Nishiyama Y., Murata N.* Glycinebetaine alleviates the inhibitory effect of moderate heat stress on the repair of photosystem II during photoinhibition // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1767. P. 1363.
10. *Kreslavski V.D., Balakhnina T.I., Khristin M.S., Bukhov N.G.* Pretreatment of bean seedlings by choline compounds increases the resistance of photosynthetic apparatus to UV radiation and elevated temperatures // *Photosynthetica.* 2001. V. 39. P. 353.
11. *Kreslavski V., Tatarinzev N., Shabnova N., Semenova G., Kosobryukhov A.* Characterization of the nature of photosynthetic recovery of wheat seedlings from short-term dark heat exposures and analysis of the mode of acclimation to different light intensities // *J. Plant Physiol.* 2008. V. 165. P. 1592.
12. *Goltsev V.N., Kalaji H.M., Paunov M., Bąba W., Horacek T., Mojski J., Kociel H., Allakhverdiev S.I.* Variable chlorophyll fluorescence and its use for assessing physiological condition of plant photosynthetic apparatus // *Russ. J. Plant Physiol.* 2016. V. 63. P. 869.
13. *Kuwabara T., Murata N.* An improved purification method and a further characterization of the 33-kilodalton protein of spinach chloroplasts // *Biochim. Biophys. Acta.* 1982. V. 680. P. 210.
14. *Peter G.F., Thornberg J.P.* Biochemical composition and organization of higher plants photosystem 2 light-harvesting pigment-proteins // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 16745.
15. *Dekker J.P., Hassold A., Petterson A., Roon Van H., Groot M.-L., R. Van Grondelle.* On the nature of the F695 and F685 emission of photosystem II // *Photosynthesis: from Light to Biosphere / Ed. Mathis P.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. V. 1. P. 53.
16. *Allakhverdiev S.I., Kreslavski V.D., Klimov V.V., Los D.A., Carpentier R., Mohanty P.* Heat stress: An overview of molecular responses in photosynthesis // *Photosynth. Res.* 2008. V. 98. P. 541.
17. *Thompson L.K., Blaylock R., Sturtevant J.M., Brudvig G.W.* Molecular basis of the heat denaturation of photosystem II // *Biochemistry.* 1989. V. 28. P. 6686.
18. *Mohanty P., Kreslavski V.D., Klimov V.V., Los D.A., Mimuro M., Carpentier R., Allakhverdiev S.I.* Heat Stress: Susceptibility, Recovery and Regulation // *Photosynthesis. Advances in Photosynthesis and Respiration.*

- tion / Eds. Eaton-Rye J., Tripathy B., Sharkey T. Dordrecht: Springer, 2012. V. 34.
19. *Yamane Y., Kashino Y., Koike H., Satoh K.* Effects of high temperatures on photosynthetic systems in spinach: Oxygen-evolving activities, fluorescence characteristics and the denaturation process // *Photosynth. Res.* 1998. V. 57. P.51.
  20. *Yamane Y., Kashino Y., Koike H., Satoh K.* Increases in the fluorescence  $F_0$  level and reversible inhibition of Photosystem II reaction center by high temperature treatments in high plants // *Photosynth. Res.* 1997. V. 52. P. 57.
  21. *Bricker T.M., Ghanotakis D.F.* Introduction to oxygen evolution and the oxygen-evolving complex // *Oxygenic photosynthesis: the light reactions* / Eds. Ort D.R., Yocum C.F. Dordrecht: Springer, 1996. P. 113.
  22. *Cajanec V., Stoch M., Lachetova I., Kalina J., Spunda V.* Characterization of the photosystem II inactivation of heat-stressed barley leaves as monitored by the various parameters of chlorophyll *a* fluorescence and delayed fluorescence // *J. Photochem. Photobiol.* 1998. V. 47. P. 39.
  23. *Nash D., Miyao M., Murata N.* Heat inactivation of oxygen evolution in photosystem II particles and its acceleration by chloride depletion and exogenous manganese // *Biochim. Biophys. Acta.* 1985. V. 807. P. 127.
  24. *Voskresenskaya N.P.* Control of the activity of the photosynthetic apparatus in higher plants. // *Blue light Effects in Biological Systems* / Ed. Senger H. Berlin, Heidelberg: Springer, 1984. P. 407.
  25. *Takemiya A., Inoue S., Doi M.* Phototropins promote plant growth in response to blue light in low light environments // *Plant Cell.* 2005. V. 17. P. 1120.
  26. *Zheng L., Van Labeke M.-C.* Long-term effects of red- and blue-light emitting diodes on leaf anatomy and photosynthetic efficiency of three ornamental pot plants // *Front. Plant Sci.* 2017. V.9. P. 917.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
СТАТЬИ

УДК 581.1

СУПЕРИНОКУЛЯЦИЯ *Nicotiana benthamiana* СПОСОБСТВУЕТ РАЗВИТИЮ  
ИММУНИТЕТА К ВИРУСУ КУСТИСТОЙ КАРЛИКОВОСТИ ТОМАТОВ

© 2021 г. А. Б. Дилдабек<sup>а</sup>, З. Б. Стамгалиева<sup>а</sup>, Б. Б. Ильясова<sup>б</sup>, Ж. Б. Тлеукулова<sup>а</sup>,  
А. А. Мадиров<sup>а</sup>, С. М. Касенова<sup>а</sup>, Р. Т. Омаров<sup>а</sup>, С. К. Наекова<sup>а</sup>, А. Ж. Акбасова<sup>а</sup>, \*

<sup>а</sup>Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Нур-Султан, Казахстан

<sup>б</sup>Назарбаев университет, Нур-Султан, Казахстан

\*e-mail: a.j.alua@gmail.com

Поступила в редакцию 03.09.2020 г.

После доработки 23.11.2020 г.

Принята к публикации 21.12.2020 г.

С момента посадки растения подвержены поражению различными видами патогенов, в том числе и вирусами. Традиционный подход в борьбе с вирусными, грибными и бактериальными инфекциями предполагает применение пестицидов, также отбор сортов, устойчивых к патогенам. Помимо фундаментальных аспектов, механизм РНК-интерференции, обусловленный способностью элиминировать чужеродные нуклеиновые кислоты, применим для повышения устойчивости растений к различным видам биотических стрессов. Этот подход заключается в применении эндогенных и экзогенных коротких интерферирующих РНК. Феномен “суперинфекция” был открыт в 1929 году. Он предполагает устойчивость растения, пораженного ослабленной формой вируса, к повторному заражению наиболее патогенным штаммом того же вируса. В данной статье процесс повторной инокуляции мы именуем суперинокуляцией. Суперинокуляция подразумевает повторное инокулирование растения дикой формой вируса после инфекции растений мутантной формой вируса, не содержащей патологической активности, что запускает ответную реакцию фитоиммунитета на последующее вторжение дикого типа. При повторной инокуляции растений табака (*Nicotiana benthamiana*) диким типом вируса, которые были предварительно инфицированы мутантной формой вируса кустистой карликовости томатов (*Tomato bushy stunt virus*), дефектной по белку-супрессору, растения демонстрировали фенотип восстановления, представленный элиминацией геномной РНК *Tomato bushy stunt virus* и его вирусного супрессорного белка в тканях растений.

**Ключевые слова:** *Nicotiana benthamiana*, *Tomato bushy stunt virus*, РНК-интерференция, супрессор, иммунитет, мутант, системная инфекция, инокуляция

DOI: 10.31857/S0015330321040047

ВВЕДЕНИЕ

Вирусы являются причиной различных заболеваний растений, тем самым нанося огромный вред развитию сельского хозяйства. Полная невосприимчивость растительного организма к вирусной инфекции называется иммунитетом. Один из способов невосприимчивости — консервативный путь, характерный для эукариот, — механизм РНК-интерференции.

РНК-интерференция — эволюционно консервативный и специфичный к последовательности нуклеиновых кислот механизм, запускающийся двухцепочечными молекулами РНК и регулирующий процесс экспрессии генов у эукариот. РНК-интерференция является защитой организма от посторонних нуклеиновых кислот, тем самым являясь одной из основных линий иммунитета против вирусных инфекций [1]. Репликация вируса активирует процесс запуска РНК-интерференции.

В инфицированных клетках индукторами процесса являются различные типы двухцепочечных молекул РНК. Длинные двухцепочечные РНК возникают в процессе репликации вируса (для РНК вирусов), двунаправленной транскрипции вирусного генома (для ДНК вирусов), внутримолекулярного спаривания вирусных РНК и их биосинтеза *de novo* эндогенными РНК-зависимыми РНК-полимеразами [2]. Эндорибонуклеаза Dicer и остальные представители семейства белков Dicer (DCL — Dicer-Like enzymes) процессируют двухцепочечные РНК в вирусные короткие интерферирующие РНК (киРНК). Данный вид малых интерферирующих РНК интегрируется с белками семейства AGO (Argonaute proteins), формируя тем самым РНК-индуцированный комплекс замалчивания генов (RNA-induced silencing complex — RISC-комплекс). Инкорпорированная молекула короткой интерферирующей РНК комплементарна после-

довательности таргетированного вируса и является направляющей силой транскрипционного сайленсинга генов посредством РНК-направленного метилирования ДНК для подавления транскрипции гомологичных ДНК или пост-транскрипционного сайленсинга генов, что включает в себя сплайсинг и деградацию или трансляционную репрессию вирусных РНК [3].

Короткие РНК наряду с микро-РНК участвуют во множестве биологических процессов, включая процессы развития и ответа к стрессовым факторам [4]. Существует три типа взаимодействий между растительными вирусами и ки-РНК растения-хозяина: прямой эффект ки-РНК на вирусный патоген; непрямой эффект вирусной инфекции на популяцию ки-РНК; эффект вирусных супрессорных белков на популяцию ки-РНК, что часто ведет к развитию симптомов. ки-РНК, помимо регуляции эндогенной экспрессии генов, участвуют в иммунных реакциях, выступая как малые интерферирующие РНК, нацеленные на вирусный ген [5].

*Tomato bushy stunt virus* (TBSV) – вирус рода *Tombusvirus*, семейства *Tombusviridae*, смысловой одноцепочечный РНК-вирус [6]. В первую очередь TBSV инфицирует корни, при системном распространении инфекции колонизирует все типы клеток. Вирионы были найдены во всех частях растительной клетки, включая цитоплазму, ядро, митохондрии и клеточные вакуоли. В природных условиях TBSV распространяется в почве без помощи какого-либо вектора. В условиях эксперимента применяется механическая инокуляция [7].

Белки-супрессоры играют ключевую роль в подавлении защитной РНК-интерференции, успешной аккумуляции вируса и его распространении в тканях растений [8]. Белок-супрессор P19 вируса кустистой карликовости томатов является фактором патогенности, важность которого выражается в развитии симптомов инфекции [9].

Функция P19 заключается в том, что в ходе инфекции белок электростатически взаимодействует с обильно циркулирующими вирусными малыми интерферирующими РНК, делая их недоступными для программирования RISC-комплекса, активность которого направлена на разрушение вирусной РНК. В конечном счете происходит накопление вирусных молекул РНК в инфицированном растении. Кроме этого было установлено, что P19 также препятствует процессу защитного метилирования микроРНК [10]. Супрессорная активность P19 поддерживает уровень РНК вируса кустистой карликовости томатов на протяжении инфекции и способствует повышению аккумуляции других вирусных белков, индуцирующих симптомы [11]. Возможно, что белок-супрессор P19 имеет сродство к дуплексам или шпилькам микро-РНК [12], тем самым опосредуя вызванные симптомы функциями

важных для развития эндогенных РНК. Быстрая аккумуляция вирусных двухцепочечных РНК приводит к насыщению доступного пула RISK-комплекса, приводя к отсутствию возможности связывать ки-РНК.

В растениях *N. benthamiana*, лишенных экспрессии белка P19 происходит активация РНК-интерференции, которая приводит к деградации вирусной РНК посредством RISC-комплекса. В присутствии димера P19 происходит связывание белка-супрессора с малыми интерферирующими РНК, что предотвращает активацию RISC-комплекса и, соответственно, приводит к системной инфекции. Кроме этого, белки-продукты генов резистентности (R-гены) распознают увеличенную экспрессию белка P19 и запускают реакцию сверхчувствительности [13].

Феномен “суперинфекция”, открытый в 30-е гг. XX века, предполагает устойчивость растения, пораженного ослабленной формой вируса к повторному заражению наиболее патогенным штаммом того же вируса [14]. Это явление характерно также для вирусов животных и бактерий. Данный подход применялся для защиты растений от вирусных патогенов. Некоторые из примеров вирусов, для которых такой подход оказался успешным, включают вирус желтой мозаики кабачков в кабачках, дынях и арбузах, вирус томатной мозаики в помидорах и перце и вирус кольцевой пятнистости папайи в папайе [15].

Механизм РНК-интерференции активно применяется в течение последних десяти лет как инструмент в исследованиях функции генов. В добавок к фундаментальным аспектам, механизм используется для повышения резистентности растений к различным видам биотического стресса. Данный механизм может быть использован для контроля сельскохозяйственно значимых заболеваний растений [16]. Такой подход предполагает применение эндогенных (трансгенные растения) [17] и экзогенных (экзогенная обработка или деградирующие носители) [18] ки-РНК. Вследствие ограничений в разработке генетически модифицированных растений исследования в области фундаментальных механизмов фитоиммунитета и разработка подобных подходов предполагают использование альтернативных подходов против вирусных патогенов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Подготовка материала для инокуляции.** Растения *Nicotiana benthamiana* выращивали в теплице в условиях 16-часового фотопериода (16 ч – день, 8 ч – ночь) при средней температуре – 24–26°C, влажности – 75–80%). В качестве источника света использовали лампы Bulbs Econ, 230 В. С целью равномерного распределения света растения перемещали по стеллажам каждые 3–5 дней.

Рестрикция выделенных плазмид pUC19 была проведена рестрикционной эндонуклеазой Sma I (Thermo Fisher Scientific, США). Линеаризованные плазмиды далее служили матрицей для синтеза матричной РНК вируса кустистой карликовости томатов (TBSV wt) [19] и его мутантной формы (TBSV $\Delta$ P19), которая была сконструирована заменой нуклеотидов в последовательности старт кодона P19 белка в субгеномной РНК вируса, что привело к отсутствию считывания белка P19 [20]. Транскрипты синтезировали полимеразой T7 (T7 Transcription Kit, Thermo Fisher Scientific, США). При этом в реакцию синтеза транскриптов не был включен аналог кэп-структуры. Реакция *in vitro* транскрипции была проведена согласно руководству производителя. Рабочая концентрация транскриптов составляла 5–10 нг/мкл на одно растение в 10 мМ натрий-фосфатном буфере, объемом 500–1000 мкл [21].

Для суперинокуляции были очищены вирионы вируса кустистой карликовости томатов методом колоночной хроматографии на гидроксипатите [22]. Параметры колонки: диаметр – 25 мм, высота – 5 см. В колонку вносили 5 мл раствора гидроксипатита в фосфатном буфере (Hydroxapatite Bio-Gel, BioRad, США) в качестве неподвижной фазы. Буфер содержал 0.01 М натрий-фосфатный буфер (рН 6.8) и 0.02% азида натрия. В качестве подвижной фазы использовали 12 мл 10 мМ натрий-фосфатного буфера (рН 6.9). В колонку вносили грубый экстракт инфицированного растения. Апикальные листья *N. benthamiana* с ярко выраженными симптомами гомогенизировались в 1 мл ТЕ-буфера (Tris-HCl 100 мМ, рН 8.0; 1 мМ EDTA). Далее гомогенат центрифугировали 25 мин при 10 000 об/мин, 4°C. Супернатант объемом 1 мл вносился в колонку. Сбор фракций вирионов был проведен последовательно с периодическим пропуском фосфатного буфера через колонку. Наличие очищенных вирионов в собранных фракциях было определено методом экспресс-теста, который будет описан далее.

**Инокуляция растений.** В возрасте 30–35 дней растения *N. benthamiana* подвергали отбору для соблюдения одинаковых условий эксперимента. Критериями отбора служили общая вегетативная масса, высота растения и степень развития листовых пластинок.

Для улучшения проникновения вирусного материала инокуляция была проведена методом механической инокуляции, при котором поверхность листовых пластинок повреждалась абразивным материалом с дальнейшим втиранием суспензии с вирусным материалом. В качестве абразивного материала использовали оксид кремния (celite).

Суспензия с вирусным материалом состояла из вирионов и 10 мМ натрий-фосфатного буфера (рН 6.8) в соотношении 1 : 3. Рабочая концентра-

ция вирионов – 200 нг/мкл. В случае инокуляции транскриптами, синтезированными в условиях *in vitro*, также использовался 10 мМ натрий-фосфатный буфер для разведения материала. Для инокуляции были отобраны 2–3 листа со среднего яруса.

**Определение вирионов *Tomato bushy stunt virus* в инфицированных растениях.** Для подтверждения наличия инфекции в растениях был использован экспресс-тест определения вирусных частиц [23].

Первичные антитела против вирусных частиц TBSV были получены из мышей BALB/C после долгого периода иммунизации, который занял 8 недель. При получении антител всего было поставлено 10 инъекций: (1) первые 5 поставили в течение первых 4-х недель, и (2) следующие 5 инъекций – 2-х последних недель. На 9 неделе происходил сбор антител. Иммунизация была проведена посредством использования полного и неполного адьювантов Фрейнда. На 200 мкл вирионов (200 нг/мкл) – 200 мкл адьюванта.

Верхние листья, не подвергшиеся инокуляции, использовались для определения наличия вирионов. Для определения инфекции был проведен вертикальный электрофорез в агарозном геле (1%). Визуальная детекция вирионов проводилась в гель-документирующей системе.

Для точного определения принадлежности обособленных скоплений нуклеиновых кислот к вирионам вируса кустистой карликовости томатов был проведен капиллярный перенос на нитроцеллюлозную мембрану. В качестве буфера для переноса использовался TBE-буфер с тем же массовым соотношением, что и для электрофореза. Первичные поликлональные антитела, специфичные к вирионам вируса в разведении 1 : 1000 инкубировались с мембраной в течение 2 ч. Для удаления не связавшихся антител 3 раза в течение 10 мин проводилась промывка TBS-буфером с добавлением Tween-20. Далее следовала инкубация со вторичными антителами (anti-mouse, Sigma) в разведении 1 : 5000 в течение 2 ч. Вторичные антитела конъюгированы с щелочной фосфатазой, которая гидролизует тетразолиум-5-бром-4-хлор-3-индолил фосфат (NBT-BCIP, Sigma-Aldrich, США) с последующим появлением преципитата формазана на мембране, что говорит о присутствии инфекции в тканях растений.

**Вестерн-блот-анализ.** Вестерн-блоттинг (иммуноблоттинг) белка-супрессора РНК-интерференции P19 состоял из трех последовательных этапов: разделение белков в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в присутствии SDS; перенос белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану под действием электрического поля; проявление антителами против белка-супрессора P19.

Аппаратурное оформление устройства для электроблоттинга состояло из камеры для пере-

носа белков Criterion System (Bio-Rad, США). Перенос был осуществлен в течение 2.5 ч при соблюдении следующих условий: напряжение – 150 В, сила тока – 300 мА, мощность – 50 Вт.

Далее инкубировали мембрану с первичными антителами (Anti-RNA silencing suppressor P19 antibody, Abcam, США) против белка P19 в разведении 1 : 1000. Затем была проведена инкубация мембраны со вторичными антителами (Goat Anti-Rabbit IgG Antibody, Alkaline Phosphatase conjugate, Sigma-Aldrich, США) против первичных антител в разведении 1 : 5000. В качестве субстрата использовали NBT-BCIP (Sigma-Aldrich, США).

**Выделение тотальной РНК из тканей инфицированных растений.** Тотальная РНК из тканей инфицированных растений выделена методом фенол-хлороформной экстракции с дальнейшей преципитацией этиловым спиртом [24].

0.2 г апикальных листьев гомогенизировали в 1.5 мл ТЕ-буфера с добавлением 1% SDS. В гомогенат добавляли 1 мл холодного фенол-хлороформ-изоамилового спирта в соотношении 25 : 24 : 1 (AppliChem, Германия). Затем гомогенат центрифугировали в течение 25 мин при 10000 об/мин, 4°C; отбирали верхнюю фазу и добавляли 40 мкл 3 М ацетата натрия (рН 5.2) и 1 мл 90% этилового спирта. Инкубировали образцы при –20°C в вертикальном положении в течение 2 ч. Спустя 2 ч центрифугировали образцы при 10000 об/мин, 4°C в течение 20 мин. Промыли преципитат 70% этиловым спиртом. Далее оставляли образцы сушиться для испарения остатков этилового спирта на 2.5 ч. Спустя 2.5 ч ресуспендировали осадок в 80 мкл воды.

**Детекция тотальной РНК в вертикальном геле-электрофорезе.** Для проверки качества выделенной тотальной РНК и визуализации ее общего профиля был проведен вертикальный электрофорез в 1% агарозном геле. Образцы тотальной РНК вносили совместно с 6 × загрузочным буфером. Электрофорез проводили в течение 40 мин в ТВЕ-буфере при следующих параметрах: напряжение – 110 В, сила тока – 50 мА, мощность – 5 Вт.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Подготовка материала для суперинокуляции.

Для повторной инокуляции растений были выделены вирионы из тканей инфицированного растения *N. benthamiana* вирусом кустистой карликовости томатов методом адсорбционной хроматографии на гидроксипатите. Для определения наличия вирионов во фракциях элюента проводили горизонтальный электрофорез с концентрацией агарозы 1% с дальнейшей их визуализацией под ультрафиолетовым светом. Вирионы были выбраны в качестве материала для суперинокуляции для избежа-



Негативный контроль TBSVΔP19 TBSV wt

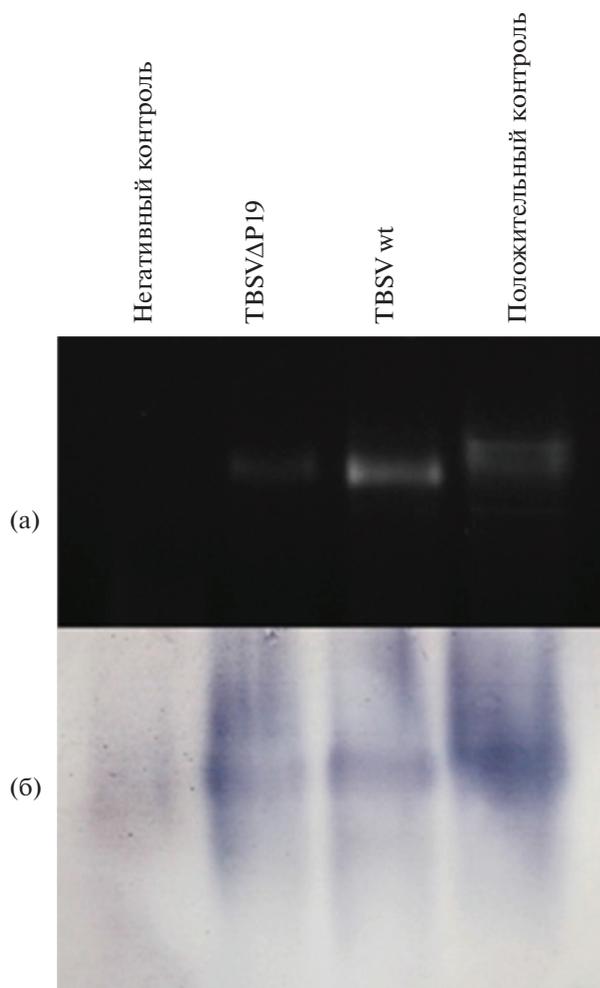
**Рис. 1.** Растения *N. benthamiana* на 7 день после инокуляции (негативный контроль – инокуляция фосфатным буфером, TBSVΔP19 – мутантная форма вируса по белку P19, TBSV wt – дикий тип вируса).

ния контаминаций, вызывающих деградации транскриптов.

Определение вирусной инфекции в инокулированных растениях. На 7 день после инокуляции растения табака, инфицированные диким типом, проявляют следующие симптомы: увядание, апикальный некроз, локальный некроз на системных листьях и задержка роста. Инфекция мутантной формой вируса по белку-супрессору P19 на 7 день после инокуляции характеризуется увяданием, отставанием в росте, мозаикой на апикальных листьях и отсутствием локального точечного некроза тканей. На 10–20 дни после инокуляции растения проявляют фенотип выздоровления (рис. 1). Наличие факта инфицирования было установлено вышеописанным экспресс-тестом определения вирусных частиц. Против вирусных белков были использованы антитела конъюгированные с щелочной фосфатазой (рис. 2). Определение наличия экспрессии супрессора РНК-интерференции белка P19 было произведено согласно методике, описанной выше. При инокуляции мутантом TBSV не происходит экспрессии белка-супрессора P19 (рис. 3).

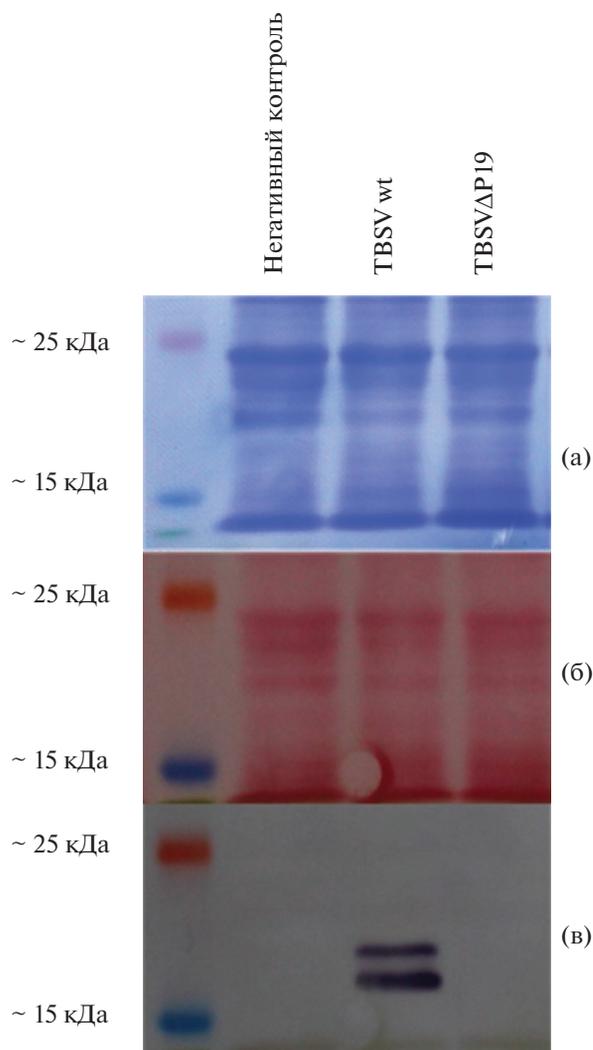
Помимо определения наличия вирусных частиц и фактора патогенности белка-супрессора P19 была выделена тотальная РНК из инфицированных растений. На рис. 4 представлен общий профиль выделенной из инфицированных растений тотальной РНК, на котором наблюдалась генная РНК вируса.

**Вторичная инокуляция растений, инфицированных мутантной формой TBSV.** На 7 день после инокуляции, серия растений, инфицированных му-



**Рис. 2.** Экспресс-тест наличия вирусных частиц в растениях *N. benthamiana* на 7 день после инокуляции (негативный контроль – инокуляция фосфатным буфером, TBSVΔP19 – мутантная форма вируса по белку P19, TBSV wt – дикий тип вируса; положительный контроль – предварительно очищенные вирионы TBSV): (а) – электрофореграмма; (б) – экспресс-тест.

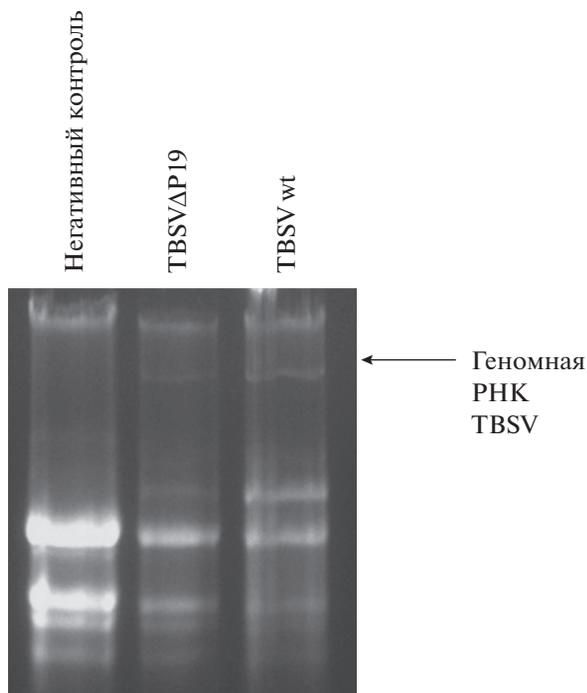
тантной формой TBSVΔP19 была инокулирована вирионами вируса кустистой карликовости томатов дикого типа. Для вторичной инокуляции были отобраны листья, располагавшиеся на один-два яруса выше тех, которые подверглись первичной инокуляции. Листья инокулировались описанным выше способом. На 7 день после суперинокуляции наблюдался фенотип выздоровления и наличие специфических пятен на листьях инфицированных растений (рис. 5). Существует предположение, что эти пятна являются локальными областями РНК-интерференции. На 7 день после суперинокуляции растения были подвергнуты анализу на наличие фактора патогенности вируса кустистой карликовости томатов, белка P19, методом иммуноблоттинга. Наблюдалась элиминация



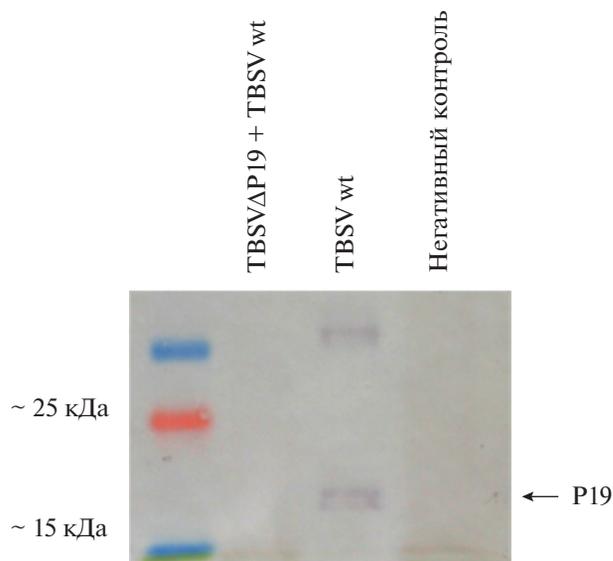
**Рис. 3.** Определение наличия фактора патогенности – супрессора РНК-интерференции белка P19 (негативный контроль – инокуляция фосфатным буфером, TBSVΔP19 – мутантная форма вируса по белку P19, TBSV – дикий тип вируса): (а) – электрофореграмма; (б) – Вестерн-блоттинг; мембрана, покрашенная красителем Ронсеау; (в) – иммуноблоттинг.

белка-супрессора P19 в тканях растений, суперинокулированных вирионами вируса кустистой карликовости томатов дикого типа (рис. 6).

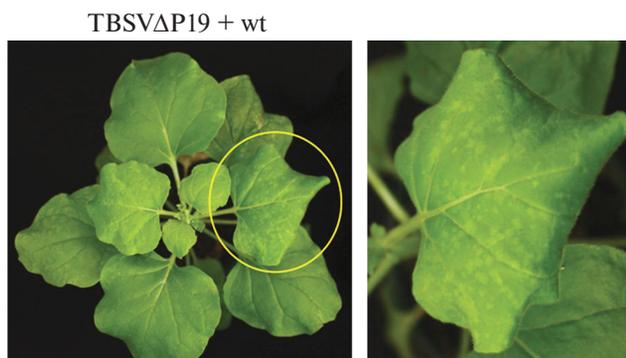
**Анализ профиля тотальной РНК в тканях суперинокулированных растений.** Выделение тотальной РНК из тканей суперинокулированных растений было проведено методом фенол-хлороформной экстракции с дальнейшей визуализацией в геледокументирующей системе. При визуализации тотальной РНК в тканях суперинокулированных растений показана элиминация геномной РНК вируса кустистой карликовости томатов, что свидетельствует о выздоровлении растения (рис. 7).



**Рис 4.** Тотальная РНК, выделенная из инфицированных растений (негативный контроль – инокуляция фосфатным буфером, TBSVΔP19 – мутантная форма вируса по белку P19, TBSVwt – дикий тип вируса).



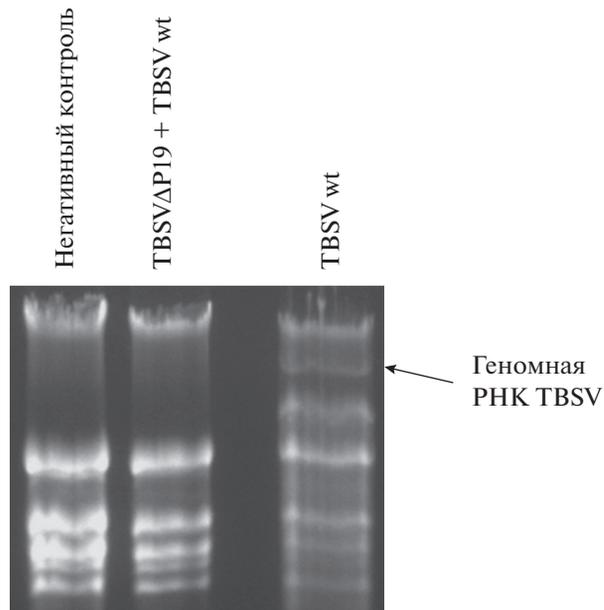
**Рис 6.** Вестерн-блот-анализ на наличие белка-супрессора РНК-интерференции P19 в тканях суперинокулированных растений (негативный контроль – инокуляция фосфатным буфером, TBSVΔP19 + TBSV wt – мутантная форма по белку P19, инокулированная диким типом вируса кустистой карликовости томатов, TBSV wt – дикий тип вируса).



**Рис 5.** Растения *N. benthamiana*, инокулированные TBSVΔP19, на 7 день после суперинокуляции.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Впервые вирус кустистой карликовости томатов был обнаружен в томатах. Согласно литературным источникам, по степени устойчивости к патогенам различного рода растения делятся на чувствительные, толерантные, сверхчувствительные и крайне устойчивые [25]. Растения *N. benthamiana* относятся к категории чувствительных растений, что проявляется в умеренных симптомах в виде скручивания апикальных листьев на 3 день после инокуляции, симптомах системной инфекции в виде увядания и мозаики на 5 день после инокуляции, а также локального некроза тканей апикальных листьев на 7 день после инокуляции;



**Рис 7.** Тотальная РНК, выделенная из повторно инфицированных растений (негативный контроль – инокуляция фосфатным буфером, TBSVΔP19 + wt – мутантная форма вируса по белку P19 + суперинокуляция вирионами дикого типа, TBSV – дикий тип вируса).

тотальный коллапс происходит на 10–14 дни после инокуляции. Кроме того, табак *N. benthamiana* является модельным растением при изучении механизмов и путей РНК-интерференции.

Одним из классических подходов в изучении функций белков-супрессоров РНК-интерференции является их направленный мутагенез. В данной работе мы использовали вирус кустистой карликовости томатов с “выключенным” геном белка-супрессора P19. Основной функцией данного супрессора является предотвращение объединения малых интерферирующих вирусных РНК в RISC-комплекс. Растения, инфицированные мутантной формой вируса кустистой карликовости томатов, проявляют слабые симптомы из-за отсутствия фактора патогенности. Репликация и поддержание вирусного генома вполне возможны до индуцирования локального и системного иммунитета. Следствием этого является распространение первичных и вторичных вирусных малых интерферирующих РНК, амплификация которых происходит за счет РНК-зависимых РНК-полимераз. Предполагается, что на момент суперинокуляции повышен титр вторичных малых интерферирующих РНК, а количество вирусных белков-супрессоров РНК-интерференции невелико. Система РНК-интерференции подготовлена к повторной атаке вирусного патогена [8].

Помимо способности белка-супрессора P19 связываться с вирусными малыми интерферирующими РНК было замечено, что белок на начальных этапах инфекции взаимодействует с эндогенными микро-РНК [26]. Pertermann с соавт. обнаружил, что уровень микро-РНК в растениях, инфицированных диким типом, подвергается большим изменениям, чем после инфицирования вирусом с модифицированной формой белка-супрессора P19. Было установлено, что P19 имеет высокую аффинность к микро-РНК 162, регулирующей транскрипцию матричной РНК белка Dicer, генерирующего вирусные малые интерферирующие РНК, что свидетельствует о важной роли P19 во время вирусной инфекции диким типом вируса. Белок P19 также имеет слабую аффинность к микро-РНК 168, отвечающую за регуляцию экспрессии белка AGO1, одного из главного компонента RISC-комплекса, тем самым понижая уровень экспрессии микро-РНК 168 и ослабляя иммунитет растения [27]. Кроме того, присутствие P19-белка стимулирует образование микро-РНК 168. В то же время присутствие посторонних нуклеиновых кислот стимулирует экспрессию AGO1 [21]. Значит, при повторной инокуляции диким типом вируса, количество P19 белка по сравнению с белками AGO оказывается недостаточным, чтобы установить состояние патогенеза в первоначально инфицированных растениях мутантной формой вируса. Это лишнее раз подтверждает, что эффективность P19-белка зависит от его количества и что P19-белок не может предотвратить уже запущенный механизм РНК-интерференции.

При повторной инфекции наблюдается элиминация геномной РНК вируса. Предполагается,

что на момент суперинокуляции повышен титр вторичных малых интерферирующих РНК, а количество вирусных белков-супрессоров РНК-интерференции невелико. Система РНК-интерференции подготовлена к повторной атаке вирусного патогена. Также предполагается, что при повторной инокуляции диким типом вируса, количество P19-белка по сравнению с белками AGO оказывается недостаточным, чтобы установить состояние патогенеза в первоначально инфицированных растениях мутантной формой вируса [22]. Это лишнее раз подтверждает, что эффективность P19-белка зависит от его количества и то, что P19-белок не может предотвратить уже запущенный механизм РНК-интерференции.

Данная работа требует дополнительных исследований с целью выявления влияния взаимодействия эндогенных и экзогенных факторов и вирусного белка-супрессора РНК-интерференции на реакции невосприимчивости растительного организма.

Работа выполнена при финансовой поддержке Комитета Науки Министерства Образования и Науки Республики Казахстан (гранты AP05135633, AP09058098) и государственной программы (№ BR05236574).

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Baulcombe D.* RNA silencing in plants // *Nature*. 2004. V. 431. P. 356. <https://doi.org/10.1038/nature02874>
2. *Boualem A., Dogimont C., Bendahmane A.* The battle for survival between viruses and their host plants // *Curr. Opin. Virol.* 2016. V. 17. P. 32.
3. *Yang Z., Li Y.* Dissection of RNAi-based antiviral immunity in plants // *Curr. Opin. Virol.* 2018. V. 32. P. 88.
4. *Guo Z., Li Y., Ding S.-W.* Small RNA-based antimicrobial immunity // *Nat. Rev. Immunol.* 2019. V. 19. P. 31.
5. *Hull R.* Mathews' plant virology. London: Academic Press, 2014. 1056 p.
6. *Rastgou M., Habibi M.K., Izadpanah K., Masenga V., Milne R.G., Wolf Y.I., Koonin E.V., Turina M.* Molecular characterization of the plant virus genus Ourmiavirus and evidence of inter-kingdom reassortment of viral genome segments as its possible route of origin // *J. Gen. Virol.* 2009. V. 90. P. 2525.
7. International Committee on Taxonomy of Viruses (2011). [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna\\_viruses/277/tombusviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/277/tombusviridae)
8. *Omarov R., Sparks K., Smith L., Zindovic J., Scholthof H.B.* Biological Relevance of a Stable Biochemical Interaction between the Tombusvirus-Encoded P19 and Short Interfering RNAs // *J. Virol.* 2006. V. 80. P. 3000.

9. *Scholthof H.B.* The Tombusvirus – encoded P19: from irrelevance to elegance // *Nat. Rev. Microbiol.* 2006. V. 4. P. 405.
10. *Du P., Wu J., Zhang J., Zhao S., Zheng H., Gao G., Wei L., Li Y.* Viral Infection Induces Expression of Novel Phased MicroRNAs from Conserved Cellular MicroRNA Precursors // *PLoS Pathog.* 2011. V. 7: e1002176
11. *Qiu W., Scholthof H.B.* Effects of inactivation of the coat protein and movement genes of Tomato bushy stunt virus on early accumulation of genomic and subgenomic RNAs // *J. Gen. Virol.* 2001. V. 82. P. 3107.
12. *Chapman E.J., Prokhnovsky A.I., Gopinath K., Dolja V.V., Carrington J.C.* Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step // *Genes Dev.* 2004. V. 18. P. 1179.
13. *Park J.-W., Faure-Rabasse S., Robinson M.A., Desvoyes B., Scholthof H.B.* The multifunctional plant viral suppressor of gene silencing P19 interacts with itself and an RNA binding host protein // *Virology.* 2004. V. 323. P. 49.
14. *Zhang X.-F., Zhang S., Guo Q., Sun R., Wei T., Qu F.* A New Mechanistic Model for Viral Cross Protection and Superinfection Exclusion // *Frontiers in Plant Science.* 2018. V. 9: 40.
15. *Bergua M., Kang S.-H., Folimonova S.Y.* Understanding superinfection exclusion by complex populations of Citrus tristeza virus // *Virology.* 2016. V. 499. P. 331.
16. *Koch A., Kogel K.-H.* New wind in the sails: improving the agronomic value of crop plants through RNAi-mediated gene silencing // *Plant Biotechnol. J.* 2014. V. 12. P. 821.
17. *Koch A., Biedenkopf D., Furch A., Weber L., Roszbach O., Abdellatef E., Linicus L., Johannsmeier J., Jelonek L., Goesmann A., Cardoza V., McMillan J., Mentzel T., Kogel K.-H.* An RNAi-Based Control of Fusarium graminearum Infections Through Spraying of Long dsRNAs Involves a Plant Passage and Is Controlled by the Fungal Silencing Machinery // *PLoS Pathog.* 2016. V. 12: e1005901.
18. *Kaldis A., Berbati M., Melita O., Reppa C., Holeva M., Otten P., Voloudakis A.* Exogenously applied dsRNA molecules deriving from the Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) genome move systemically and protect cucurbits against ZYMV // *Mol. Plant Pathol.* 2018. V. 19. P. 883.
19. *Hearne P.Q., Knorr D.A., Hillman B.I., Morris T.J.* The complete genome structure and synthesis of infectious RNA from clones of tomato bushy stunt virus // *Virology.* 1990. V. 177. P. 141.
20. *Scholthof H.B., Scholthof K.B., Kikkert M., Jackson A.O.* Tomato Bushy Stunt Virus Spread Is Regulated by Two Nested Genes That Function in Cell-to-Cell Movement and Host-Dependent Systemic Invasion // *Virology.* 1995. V. 213. P. 425.
21. *Scholthof H.B.* The Capsid Protein Gene of Tomato Bushy Stunt Virus Is Dispensable for Systemic Movement and Can Be Replaced for Localized Expression of Foreign Genes // *MPMI.* 1993. V. 6. P. 309.
22. *Омаров П.Т., Ергалиев Т.М., Акбасова А.Ж., Сутула М.Ю., Мукиянова Г.С., Жангазин С.Б., Масалимов Ж.К., Бари А.А., Нурбекова Ж.А., Тлеукулова Ж.Б., Гаджимурадова А.М., Батыршина Ж.С.* Патент РК № 2039, 2016.
23. *Омаров П.Т., Сутула М.Ю., Акбасова А.Ж., Шамекова М.Х., Бари А.А., Батыршина Ж.С., Бектурова А.Ж., Гаджимурадова А.М., Масалимов Ж.К., Нурбекова Ж.А., Ергалиев Т.М., Тлеукулова Ж.Б., Жангазин С.Б., Мукиянова Г.С.* Патент РК № 3684, 2019.
24. *Toni L.S., Garcia A.M., Jeffrey D.A., Jiang X., Stauffer B.L., Miyamoto S.D., Sucharov C.C.* Optimization of phenol-chloroform RNA extraction // *MethodsX.* 2018. V. 5. P. 599.
25. *Hull R.* Plant Virology. Academic Press, 2013. 1119 p.
26. *Pertermann R., Tamilarasan S., Gursinsky T., Gambino G., Schuck J., Weinholdt C., Lilie H., Grosse I., Golbik R.P., Pantaleo V., Behrens S.-E.* A Viral Suppressor Modulates the Plant Immune Response Early in Infection by Regulating MicroRNA Activity // *mBio.* 2018. V. 9: e00419-18.
27. *Varallyay E., Valoczi A., Agyi A., Burgyan J., Havelda Z.* Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation // *EMBO J.* 2010. V. 29. P. 3507.

## ОЦЕНКА ГЛУТАТИОНОВОГО СТАТУСА В КОРНЯХ ТРАНСГЕННЫХ ПО ГЕНАМ *psl* И *rapA1* РАСТЕНИЙ ТОМАТА ПРИ ДЕЙСТВИИ *Rhizobium leguminosarum*

© 2021 г. З. Р. Вершинина<sup>а</sup>, О. В. Чубукова<sup>а</sup>, Д. Р. Масленникова<sup>а</sup>. \*

<sup>а</sup>Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение  
Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

\*e-mail: dishaoil@mail.ru

Поступила в редакцию 29.01.2021 г.

После доработки 26.02.2021 г.

Принята к публикации 26.02.2021 г.

Исследовали уровень глутатиона в корнях растений томата (*Solanum lycopersicum* L.), трансгенных по генам *psl* и *rapA1*, в присутствии микросимбионта бобовых растений *Rhizobium leguminosarum* VSy3. Трансформированные геном *psl* растения показали более высокие результаты по адгезии бактерий, чем в случае их трансформации геном *rapA1*, что положительно коррелировало с ростовыми параметрами растений. Обработка ризобиями повышала содержание глутатиона в корнях растений дикого типа в 3 раза, в корнях растений, трансформированных геном *rapA1* – в 4.7 раз, а в растениях, трансгенных по гену *psl* – более чем в 5 раз. Полученные результаты дают основание утверждать, что количественные показатели содержания глутатиона в корнях могут служить маркером эффективности полученных *de novo* искусственных симбиотических систем.

**Ключевые слова:** *Solanum lycopersicum*, *Rhizobium leguminosarum*, глутатион, *psl*, *rapA1*, искусственные симбиотические системы

**DOI:** 10.31857/S0015330321050225

### ВВЕДЕНИЕ

Ризобии, известные как клубенькообразующие бактерии бобовых растений, могут служить в качестве ассоциативных ростостимулирующих микросимбионтов для многих не бобовых культур. Для успешной колонизации корневых волосков штаммы ризобий должны обладать высокой конкурентоспособностью, чтобы соперничать со множеством различных микроорганизмов, обитающих в ризосфере, а также рядом механизмов для успешного подавления или преодоления иммунной системы растений. В процессе образования классического симбиотического взаимодействия в системе бобовое растение – ризобии происходит образование клубеньков, формирующихся в результате скоординированной многоступенчатой дифференциации клеток растений и бактерий. Анализ этих сложных процессов выявил положительную корреляцию между содержанием глутатиона (восстановленный глутатион, GSH) и аскорбата, активностью ферментов, участвующих в аскорбат – глутатионовом цикле, и эффективностью фиксации азота в клубеньках, что позволило предположить важность этих антиоксидантов для азотфиксирующего сим-

биоза [1]. Данные, приведенные в одной из первых работ, посвященной изучению роли глутатиона в реализации симбиотических взаимодействий, дают основание утверждать, что глутатион крайне необходим самим бактериям для нормального роста и размножения, кроме того, он является лимитирующим фактором для процесса формирования как ассоциативных симбиозов, так и симбиозов, образующих новые клеточные компартменты (клубеньки) [2]. Так, штамм бактерий *Sinorhizobium meliloti* SmgshA, дефектный по гену *gshA*, который кодирует фермент первой стадии биосинтеза GSH, был не способен к росту, что, также исключало возможность клубенькообразования на поверхности корней люцерны, а мутант SmgshB, дефектный по ферменту второй стадии синтеза GSH, был способен к росту, но образовывал аномальные клубеньки с низкой эффективностью азотфиксации по сравнению с диким типом. При этом оба штамма показали повышенный уровень активности каталазы, что свидетельствует о развитах в них окислительного стресса и подтверждает участие глутатиона в защите азотфиксирующего комплекса от токсичных форм кислорода, образующихся в результате активного метаболизма клубеньков [2]. Ранее было показано, что GSH играет не только фундаментальную роль в росте и

**Сокращения:** GSH – восстановленный глутатион; GSSG – окисленный глутатион; МДА – малоновый диальдегид.

размножении бактерий, но и непосредственно участвует в развитии инфекционных нитей и регуляции экспрессии бактериальных симбиотических генов [3, 4].

С другой стороны, глутатион играет огромную роль в регуляции роста и развития растений на протяжении онтогенеза, так как присутствие сульфгидрильной группы (SH) делает GSH мощным восстанавливающим агентом в клетках. В то же время между глутамином и цистеином существует характерная  $\gamma$ -пептидная связь, которая может защищать GSH от гидролиза пептидазами, обеспечивая, таким образом, значительную стабильность. Подобная химическая структура GSH позволяет ему выполнять множество физиологических функций в жизни растений. Глутатион участвует в регуляции клеточного деления и смерти, развитии эмбриона и меристемы, прорастании пыльцы и роста пыльцевых трубок, регулирует содержание аскорбата и пероксида водорода. Кроме физиологических функций доказана роль глутатиона в реализации устойчивости растений к воздействию абиотических и биотических стрессовых факторов. Так, обработка растений экзогенным глутатионом, играющим в данном случае роль миметика элиситоров, приводила к активации защитных генов, в том числе PR1 генов. Кроме того, инфицированию патогенами растений также сопутствует накопление GSH. Это свидетельствует о вовлечении глутатиона в регуляцию редокс-статуса клетки и сигналинг различных фитогормонов в ходе воздействия биотического стресса. Наряду с этим, растениям глутатион необходим для детоксикации ксенобиотиков и тяжелых металлов, ассимиляции, транспорта и хранения серы [5].

Присутствие ризобий и проникновение бактерий в растительные клетки в рамках симбиоза приводит к изменениям поляризации плазматической мембраны, цитоскелета корневых волосков, метаболизма ауксинов и накоплению активных форм кислорода [6]. В клетках растений, вовлеченных в образование клубеньков, наблюдается накопление глутатиона и его аналога, характерного только для семейства бобовых – гомоглутатиона. Это демонстрирует критичность данного антиоксиданта в формировании бобово-ризобиального симбиоза, кроме того, накопление GSH в растительных клетках на ранних стадиях взаимодействия растений с ризобиями может являться маркером начала симбиотического процесса [7].

Процессы становления симбиоза и формирования клубеньков на корнях растений-макросимбионтов являются специфическими, и восприимчивость растений к тем или иным бактериям-микросимбионтам и успешное взаимодействие с ними определяется синтезом сигнальных молекул, продуцируемых как бактериями, так и расте-

ниями. Эти сигналы фактически являются маркерами симбиоза или определяют возможность его образования. Бактериальные поверхностные полисахариды и адгезины, растительные лектины и флавоноиды – все эти вещества являются молекулами – посредниками на ранних этапах становления симбиозов между микроорганизмами и растениями. Несомненно, данные вещества являются перспективными инструментами для модификации существующих и создания новых ассоциативных симбиотических систем. Поэтому актуально изучение способов повышения конкурентоспособности ризобий, в том числе и с помощью модификации растений, чтобы последние поддерживали на поверхности своих корней, лишь определенных микросимбионтов. Для создания эффективных новых симбиотических систем наиболее перспективным является использование генов, продукты которых непосредственно участвуют в формировании растительно-микробных взаимодействий. Ранее была разработана система агробактериальной трансформации томата (*Solanum lycopersicum* L.) промышленного сорта Грунтовый Грибовский 1180 геном лектина гороха посевного *psl*, что позволило получить устойчивые корневые ассоциации этой важной для сельского хозяйства культуры с ризобиями, защищающими от фитопатогенных грибов [8]. Кроме того, трансформация томата геном ризобиального агглютинина *rapA1* позволила получить эффективные симбиотические системы для фиторемедиации почв, загрязненных кадмием [9]. Эти результаты свидетельствуют о том, что полученные трансгенные растения томата, несмотря на то, что они не являются бобовыми растениями, успешно взаимодействуют с ризобиями на поверхности своих корней. Подобное взаимодействие, несомненно, должно отражаться на редокс – статусе корней томатов, показателем которого является содержание глутатиона, а также на содержании малонового диальдегида (МДА), конечного продукта перекисного окисления липидов мембранных структур клетки, являющегося маркером уровня окислительного стресса и потенциала выживаемости растительного организма, в том числе и при его симбиотических взаимодействиях с микроорганизмами [10, 11]. Однако, несмотря на существование целого ряда работ, посвященных формированию растительно-микробных симбиозов, на сегодняшний день, роли GSH и МДА в реализации адаптационных процессов, протекающих при взаимодействии трансгенных растений с мутуалистической микрофлорой в рамках искусственных симбиотических систем, практически остаются неизученными.

**Цель данной работы** состояла в изучении редокс-статуса глутатиона и оценки уровня МДА в разных искусственных симбиотических системах на корнях растений томата, трансформирован-

ных геном лектина гороха посевного *psl* и геном бактериального агглютинина *rapA1*, при действии бактерии *Rhizobium leguminosarum* VSy3.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объекты и материалы исследования.** В качестве макросимбионтов были использованы растения томата сорта Грунтовый Грибовский 1180, трансформированные генами *psl* и *rapA1* [8, 9]. Для работы была выбрана линия трансгенных растений, показавшая во втором поколении устойчивую экспрессию генов *psl* и *rapA1* и присутствие соответствующих белков на поверхности корней, доказанное с помощью иммунофлуоресцентного анализа.

В качестве микросимбионта в работе был использован штамм *R. leguminosarum* VSy3, выделенный из клубеньков дикорастущего бобового растения Южного Урала горошка лесного (*Vicia sylvatica* L.), обладающий ростостимулирующей активностью [12]. Для визуализации симбиотических взаимодействий ризобии были маркированы флуоресцентным белком TurboGFP [13]. Векторные конструкции в бактерии переносили методом электропорации. В качестве селективного антибиотика использовался гентамицин (50 мг/мл).

**Исследование характера колонизации бактериями корней растений.** Для экспериментов семена поверхностно стерилизовали в течение 1 мин в 70% спирте и затем 20 минут в 1% растворе гипохлорита натрия с добавлением нескольких капель Tween-20. После пятикратной промывки стерильной водой семена культивировали на среде MS [14] в течение 3 недель при температуре 25°C и 16-часовом световом дне в климатической камере KBW 400 ("Binder", Германия).

Для инокуляции растений бактерии наращивали при 28°C на шейкере (150 об/мин) в течение 2 сут в среде TY (масс. % в водном растворе: бакто-триптон 0.3%, дрожжевой экстракт 0.2%, CaCl<sub>2</sub> 0.1%) до концентрации 10<sup>8</sup> КОЕ/мл. Суспензию бактерий разбавляли до 10<sup>5</sup> КОЕ/мл стерильной жидкой средой TY, инокулировали в ней корни в течение 2 мин и переносили проростки на среду MS для сокультивации в течение 2 сут. После этого от каждого растения брали по 3 фрагмента корня длиной 1 см, отмывали их трижды стерильной водой по 5 мин на микрошейкере и гомогенизировали в 50 мкл среды LB (масс. % в водном растворе: бактотриптон 1%, дрожжевой экстракт 0.5%, NaCl 0.5%).

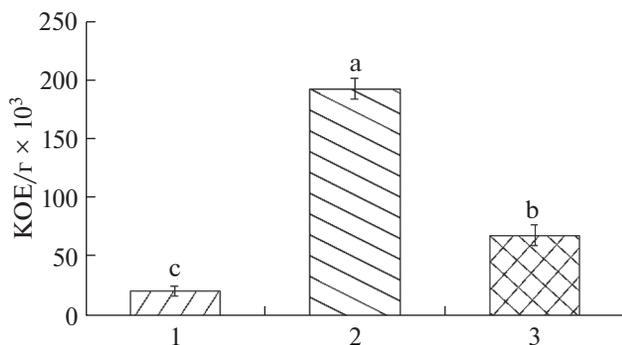
Полученный объем разбавляли в 1000 раз и 50 мкл этой суспензии рассевали на агаризованную TY среду с гентамицином (50 мг/мл) и выращивали в термостате при 28°C в течение 2 сут. Количество адгезированных бактерий определяли по числу выросших колоний и выражали в колониеобразующих единицах КОЕ/г сухой биомассы корней.

Также на этом этапе работы у части растений отделяли корни, взвешивали, замораживали и использовали для дальнейшего определения содержания GSH, GSSG и МДА. Отдельные фрагменты корней использовали для визуальной оценки колонизации бактериями поверхности корневых волосков растений с использованием флуоресцентного микроскопа Axio Imager M1 ("Carl Zeiss", Германия).

Часть растений, инокулированных бактериями, оставляли на сокультивацию в течение недели на среде MS и по прошествии этого времени фотографировали и определяли сухую биомассу корней.

**Метод определения содержания глутатиона.** Содержание восстановленной (GSH) и окисленной (GSSG) форм глутатиона из одной растительной навески определяли с помощью спектрофлуориметрического метода, основанного на получении флуоресцирующего продукта о-фталевого альдегида ("Sigma", Австралия) в зависимости от pH среды. Навеску корней около 0.5 г гомогенизировали в 4 мл смеси, состоящей из 0.1 М калий фосфатного буфера (pH 8.0) и 25% раствора метафосфорной кислоты в соотношении 3.75 : 1 (по объему) как рекомендовано в работе Hissin и Hilf [15]. Гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 8000 g, затем надосадочную жидкость повторно центрифугировали 5 мин при 13000 g. Количественную оценку GSH и GSSG в полученном супернатанте проводили с использованием реагентов, детально описанных в работе Масленниковой с соавторами [16]. Для оценки содержания GSH и GSSG регистрировали кинетику интенсивности флуоресценции образовавшихся комплексов при температуре 25°C с использованием прибора Enspire Model 2300 Multilabel Microplate Reader ("PerkinElmer", США) при 420 нм (длина волны возбуждения 350 нм). Содержание белка определяли по методу Бредфорда [17]. Содержание GSH и GSSG выражали в мкмоль/мг белка.

**Определение эндогенного уровня МДА.** Содержание МДА определяли с помощью цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой [16]. Для этого навеску растительного материала (0.5 г) гомогенизировали в 5 мл 10% трихлоруксусной кислоты с последующим центрифугированием гомогената в течение 15 мин при 13000 g. К супернатанту добавляли равный объем раствора 0.5% тиобарбитуровой кислоты в 20% трихлоруксусной кислоте. Полученную смесь инкубировали на водяной бане в течение 30 мин при 100°C, охлаждали и центрифугировали 15 мин при 13000 g. Оптическую плотность надосадочной жидкости определяли при 532 нм (максимум светопоглощения МДА) и 600 нм (для поправки на неспецифическое светопоглощение) с использованием прибора Spectrophotometer Smart Spec Plus ("BioRad", США). Концентрацию МДА рассчитывали, используя коэффици-



**Рис. 1.** Анализ колонизации корней растений штаммом *R. leguminosarum* VSy3 (KOE/г сухой биомассы корней); 1 – контрольное растение; 2 – растение, трансформированное *psl*; 3 – растение, трансформированное *rapA1*.

ент молярной экстинкции при  $155 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ , и выражали в ммоль/г сырой массы корней.

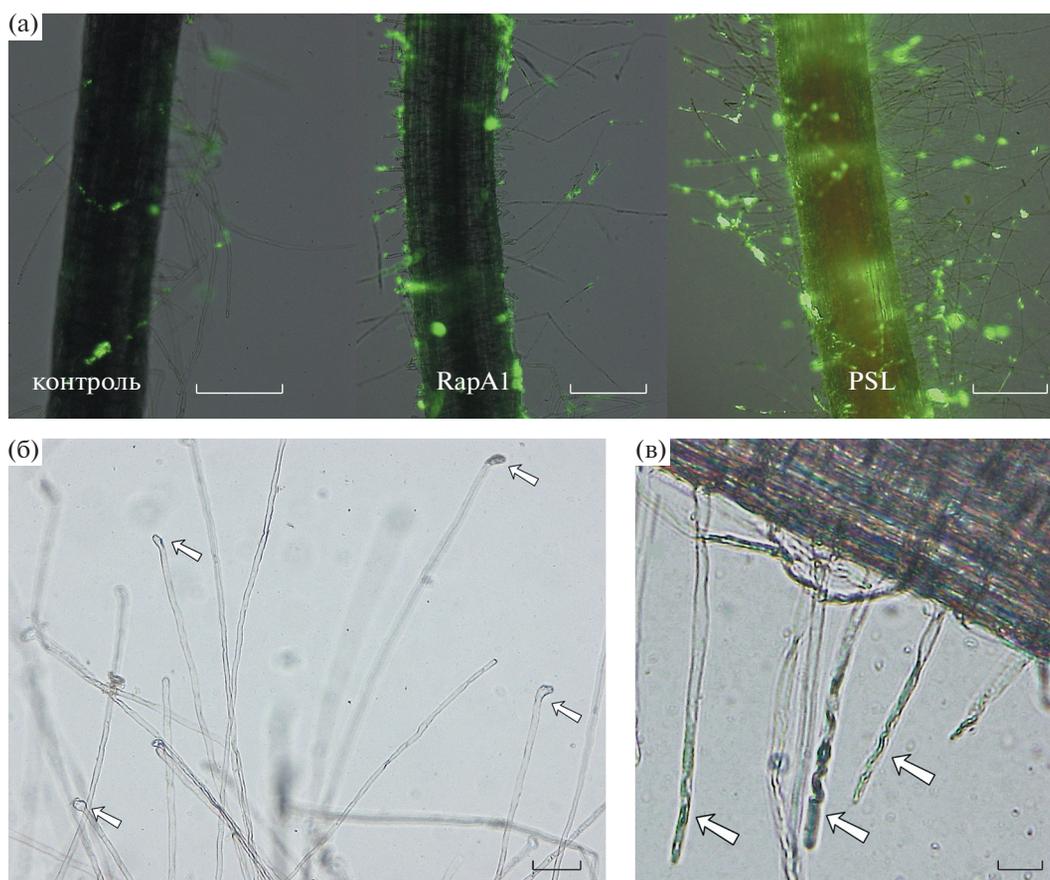
**Статистическая обработка результатов.** Эксперименты проводили в 4-кратной биологической повторности и каждый независимо воспроизводи-

ли не менее 3 раз. На рисунках приведены средние величины и их стандартные ошибки. Достоверность различий при  $P \leq 0.05$  определяли с использованием дисперсионного анализа.

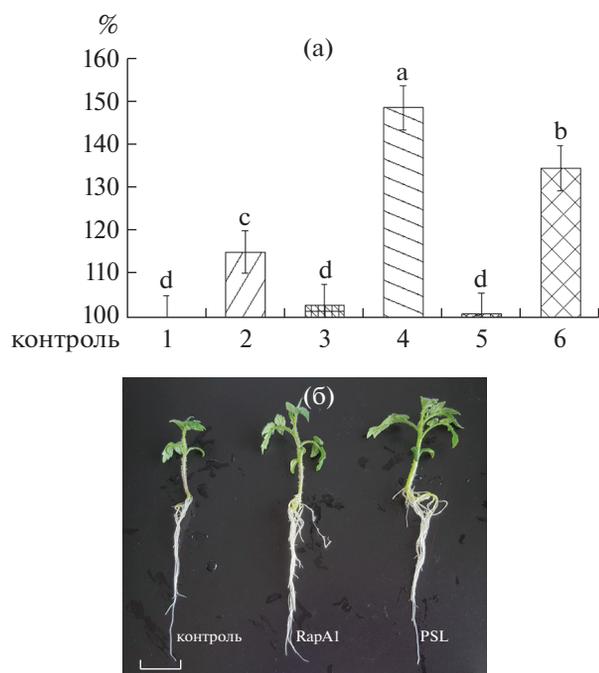
## РЕЗУЛЬТАТЫ

После инокуляции контрольных и трансгенных растений штаммом *R. leguminosarum* VSy3 (GFP) в течение 2 сут было обнаружено, что в ризосфере томата численность бактерий в пересчете на сухую биомассу корней составляет  $193.5 \pm 38.7 \text{ KOE/г} \times 10^6$  для растений, трансгенных по гену *psl*, и  $69.1 \pm 13.82 \text{ KOE/г} \times 10^6$  для растений, трансформированных геном *rapA1*. На корнях контрольных растений данная величина составляла  $21.6 \pm 4.32 \text{ KOE/г} \times 10^6$  (рис. 1).

На корнях томатов, трансформированных геном бактериального агглютинина *rapA1*, микроскопирование показало образование микроколоний (рис. 2а). На трансгенных по гену *psl* растениях после обработки бактериями было обнаружено множество скрученных корневых волосков (рис. 2б), а



**Рис. 2.** Микроскопирование корней, колонизированных штаммом *R. leguminosarum* VSy3: визуальное сравнение количества бактерий, “заякорившихся” на корнях контрольных и трансгенных растений (масштаб 1 мм) (а); закручивание корневых волосков на растениях, трансформированных *psl* (масштаб 0.01 мм) (б); инфекционные нити внутри корневых волосков на растениях, трансформированных *psl* (масштаб 0.01 мм) (в).

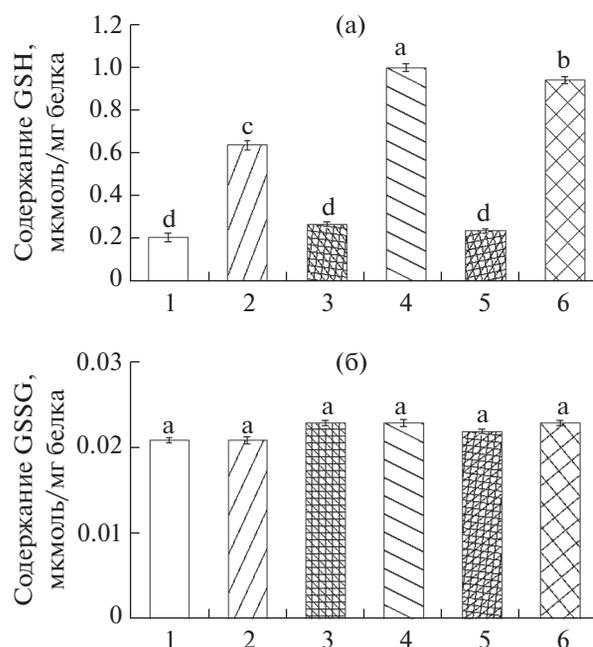


**Рис. 3.** Влияние штамма *R. leguminosarum* VSy3 на рост контрольных и трансгенных растений по прошествии 1 недели после инокуляции: показатели сухой биомассы корней (100% для контрольных растений, не обработанных бактериями) (а); контрольные и трансгенные растения (масштаб 1 см) (б); 1 – контрольное растение; 2 – контрольное растение, обработанное *R. leguminosarum* VSy3; 3 – растение, трансформированное *psl*; 4 – растение, трансформированное *psl*, обработанное *R. leguminosarum* VSy3; 5 – растение, трансформированное *rapA1*; 6 – растение, трансформированное *rapA1*, обработанное *R. leguminosarum* VSy3.

также выявлены структуры, подобные инфекционным нитям, заполненные бактериями (рис. 2в).

Совместное культивирование с ризобиями в течение 1 недели контрольных не трансгенных растений приводило к увеличению сухой биомассы корней на 15%. Данный показатель для трансгенных по гену *psl* растений составлял 50%, а для растений, трансформированных геном *rapA1* в среднем 35% (рис. 3а). Это находило отражение и во внешнем виде проростков (рис. 3б).

Анализ GSH и GSSG в корнях контрольных и трансгенных растений в присутствии ризобий показал повышение содержания GSH в корнях растений дикого типа в 3 раза, в корнях растений, трансформированных геном *rapA1* – в 4.7 раз, а в растениях, трансгенных по гену *psl* – более чем в 5 раз (рис. 4а). Необходимо отметить, что в обоих вариантах исследуемых в данной работе трансгенных растений бактерии не оказывали влияния на содержание GSSG и его показатель оставался на уровне контрольных и необработанных ризобиями растений (рис. 4б). Данные представленные на рис. 5. демонстрируют неизменный уровень МДА во всех вариантах опыта.

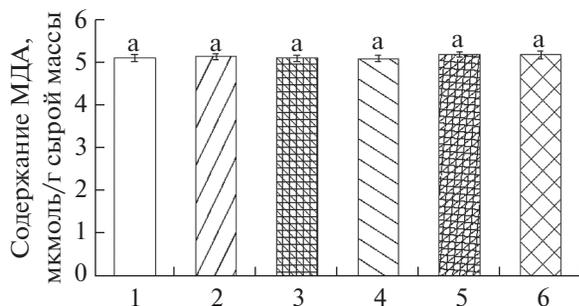


**Рис. 4.** Содержание GSH (а) и GSSG (б) в корнях растений в присутствии бактерий. Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при  $P \leq 0.05$ ; 1 – контрольное растение; 2 – контрольное растение, обработанное *R. leguminosarum* VSy3; 3 – растение, трансформированное *psl*; 4 – растение, трансформированное *psl*, обработанное *R. leguminosarum* VSy3; 5 – растение, трансформированное *rapA1*; 6 – растение, трансформированное *rapA1*, обработанное *R. leguminosarum* VSy3.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Обработка сельскохозяйственных культур микроорганизмами, способствующими росту растений, в настоящее время рассматривается как экологичная альтернатива химическим удобрениям. Ранее было показано, что штаммы *Rhizobium* могут колонизировать корни растений томата и перца, способствуя их росту на разных стадиях развития растений, повышая урожайность и качество рассады и плодов [18].

Способность растений к удержанию на поверхности своих корней полезных бактерий, в частности, ризобий, имеет принципиально важное значение для оценки перспективности образования и развития симбиотического комплекса. Сравнительный анализ количества бактерий на поверхности корней контрольных и трансформированных растений показал, что трансформированные геном *rapA1* растения, показали более низкие результаты по адгезии бактерий, чем в случае их трансформации геном растительного агглютинина (лектина) *psl*, продукт которого способен узнавать и избирательно связывать полисахариды на клеточных стенках строго определенных штаммов ризобий. При этом трансформация



**Рис. 5.** Содержание МДА в корнях растений томата. Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при  $P \leq 0.05$ ; 1 – контрольное растение; 2 – контрольное растение, обработанное *R. leguminosarum* VSY3; 3 – растение, трансформированное *psl*; 4 – растение, трансформированное *psl*, обработанное *R. leguminosarum* VSY3; 5 – растение, трансформированное *rapA1*; 6 – растение, трансформированное *rapA1*, обработанное *R. leguminosarum* VSY3.

растений геном бактериального агглютинаина *rapA1*, продукт которого непосредственно участвует в биопленкообразовании ризобий, способствовал эффективному образованию микроколоний на корнях растений, что может в перспективе повышать конкурентоспособность клубеньковых бактерий в ризосфере (рис. 2а). Эти факты полностью согласуются с данными, полученными ранее, и подтверждают взаимодействие ризобий с лектином PSL и агглютинином RapA1 на поверхности трансгенных корней [8, 9]. Кроме того, на трансгенных по гену *psl* растениях после обработки бактериями было обнаружено множество скрученных корневых волосков, характерных для начальных этапов бобово-ризобиального симбиоза (рис. 2б). Также наблюдались структуры, подобные инфекционным нитям, заполненные бактериями, которые отсутствовали на корнях растений, трансформированных геном *rapA1* (рис. 2в).

Ранее подобные неспецифические симбиотические взаимодействия были обнаружены на корнях облепихи, трансформированных геном *psl*. Было исследовано влияние экспрессии гена лектина на симбиотические реакции облепихи с ризобиями *R. leguminosarum* (симбионт гороха) и актиномицетами рода *Frankia* (симбионт облепихи). На проростках, трансгенные корни которых были обработаны данными микросимбионтами совместно, кроме обычных актиноризных клубеньков были обнаружены клубенькоподобные структуры, нехарактерные для облепихи. RAPD-анализ бактерий, выделенных из этих структур, выявил присутствие среди них ризобий *R. leguminosarum* и отсутствие актиномицетов рода *Frankia* [19]. Скручивания корневых волосков, как ранняя симбиотическая реакция, также были обнаружены на композитных растениях томата, рапса и табака, корни, которых

были трансформированы геном *psl* и в дальнейшем обработаны *R. leguminosarum*. Подобные неспецифические реакции не наблюдались после обработки растений штаммом козлятника *R. galegae*, который не узнает лектин PSL на поверхности корней [20]. Тем не менее, возможно, связывание исключительно “своих микросимбионтов” является способностью, характерной не для всех лектинов бобовых растений [21].

Оценка сухой биомассы корней, являющейся, показателем роста и физиологического состояния растений показала, что используемый в работе штамм ризобий оказывает ростостимулирующее действие на контрольные нетрансгенные растения томата. Присутствие бактерий на поверхности корней трансгенных растений приводило к значительному накоплению сухой биомассы корней у трансгенных по гену *psl* растений и значительно меньшему у растений, трансформированных геном *rapA1* (рис. 3а), что иллюстрируется внешним видом интактных растений (рис. 3б).

Ранее было показано, что *Pseudomonas* sp. 102 обладает ростостимулирующей активностью по отношению к растениям томата, в том числе в условиях токсического действия  $Cd^{2+}$ . При этом наиболее эффективно это проявлялось в случае трансгенных по гену *rapA1* растений, что было связано с более эффективной колонизацией бактериями поверхности корней. Несмотря на то, что RapA1 обнаружен лишь у нескольких видов ризобий, этот белок не является строго специфичным и может способствовать агглютинации на растениях других бактерий, отличных от ризобий, в частности некоторых штаммов *Pseudomonas* [22].

Полученные результаты показали, что растения, трансгенные, по гену *psl*, в клетки которых бактерии проникают внутрь, проявляют большую восприимчивость к присутствию ризобий. Обнаруженный более высокий уровень адгезии (в 9 раз выше, чем у дикого типа в этих же условиях) и сухой вес корней этих томатов, говорит о том, что эти растения скоординировано положительно реагируют на присутствие бактерий, запуская каскад различных реакций, влияющих на метаболизм растений, включая синтез глутатиона, который является показателем физиологического состояния растительной клетки. Растения, трансформированные геном *rapA1*, показали не такую яркую восприимчивость, и уровень исследуемых показателей у них оказался ниже относительно растений, трансформированных *psl*. Полученные результаты позволяют утверждать, что растительно-микробные ассоциации, образованные *de novo* в данной работе, представляют собой надорганизменные системы, обладающие уникальными свойствами и требующие дальнейшего изучения.

В нескольких исследованиях сообщалось, что глутатион участвует в индукции защитных генов

растений, а увеличение количества GSH и/или связанных с GSH ферментов коррелирует с устойчивостью к различным биотическим стрессам, включая атаки вирусов, бактерий и грибов. Кроме того, в различных работах показано, что снижение уровня GSH может быть причиной развития симптомов, вызванных фитопатогеном у восприимчивых растений [23]. Ранее изучали реакцию антиоксидантных систем двух сортов томатов на инфицирование псевдомонадами. У инокулированного восприимчивого к болезни сорта было обнаружено существенное снижение содержания GSH и накопление GSSG. Напротив, при взаимодействии с устойчивым сортом томата количество GSH практически не снижалось [1]. Эти результаты указывают на то, что поддержание гомеостаза глутатиона, по-видимому, вносит вклад в недоступность тканей растений для бактериальной атаки, а содержание глутатиона считается ценным индикатором биотического стресса в растениях как во время атак патогенов, так и при взаимодействии с ростостимулирующими бактериями.

В нашей работе прослеживалась четкая закономерность, чем больше GSH синтезировалось растениями в рамках исследуемых симбиотических взаимодействий (рис. 4а), тем больше бактерий адгезировалось на поверхности корней и проникало внутрь (что опосредовано присутствием генов *psl* и *I-rapA1*) (рис. 1, 2).

Известно, что глутатион необходим для деления клеток апикальной меристемы корня, а его количество регулирует переход клеток из G<sub>1</sub> в S-фазу клеточного цикла. Перемещение GSH в ядро в фазу G<sub>1</sub> сильно влияет на окислительно-восстановительное состояние цитоплазмы и экспрессию редокс-чувствительных генов. Последующее увеличение тотального клеточного пула GSH выше уровня, наблюдаемого в G<sub>1</sub>, необходимо для продвижения клетки к S-фазе цикла [24]. Исходя из этого, можно сказать, что накопленный GSH в исследуемых растениях вносит вклад в индуцируемое бактериями ростостимулирующее действие, что находит отражение в показателях сухой биомассы их корней (рис. 3а). При этом четко прослеживается прямая зависимость, чем выше содержание GSH (рис. 4а), тем больше масса корней растений томата (рис. 3а), что также положительно коррелирует с показателями по адгезии бактерий (рис. 1).

Хотя пасленовые растения не вступают в азотфиксирующий симбиоз с ризобиями, увеличение содержания GSH в нашей работе в случае инокуляции ризобиями трансгенных по генам *psl* и *rapA1* растений, возможно, объясняется наличием у томата рецепторов, практически идентичных киназам бобовых растений, содержащим LysM мотивы во внеклеточных доменах. Эти рецепторы связывают Nod факторы ризобий, вырабатываемые в ответ на синтез флавоноидов растениями, и активируют симбиотические ответы через сигнальные пути, схожие с образованием такого вида симбиоза как арбускулярная микориза, формируемая томатами с гломусовыми грибами [25]. Кроме того, ранее была показана субстратная специфичность хитиназ томата по отношению к Nod факторам ризобий, что обычно является характерным для бобовых растений [26]. Данный факт позволяет сделать вывод, что специфичность симбиоза, частично, может быть обусловлена активностью растительных хитиназ [27].

Также было показано, что у ризобий GSH участвует в адаптации к различным стрессам, как на начальных этапах симбиотических взаимодействий, так и при дифференцировке в бактериоиды. Связано это с тем, что клубеньковые бактерии сталкиваются с активными формами кислорода и активными формами азота, продуцируемыми хозяином на всех этапах симбиотического процесса [28]. GSH играет важную роль в конкурентоспособности и симбиотической эффективности ризобий. Мутантный по глутатионсинтетазе (*gshB*) штамм *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 не только слабо колонизировал ризосферу растений, но также приводил к снижению на 50% сухой биомассы растений вследствие снижения эффективности азотфиксации [29]. Поэтому, несомненно, изменения в метаболизме GSH непосредственно влияют на симбиотические взаимодействия бактерий и растений.

Необходимо отметить, что в обоих вариантах исследуемых в данной работе трансгенных растений бактерии не оказывали влияния на содержание GSSG, это говорит о том, что присутствие бактерий на поверхности этих томатов не воспринимается растениями как повреждающее (рис. 4б). Кроме того, еще одним доказательством, указывающим на отсутствие негативного действия ризобий на целостность мембранных структур клеток корней, являются результаты содержания в них МДА (рис. 5). Это еще раз подтверждает факт положительного влияния бактерий на физиологическое состояние изучаемых растений томатов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты демонстрируют перспективность изучения окислительно-восстановительного состояния глутатиона и уровня МДА в растениях для оценки эффективности искусственных симбиотических систем. Особого внимания заслуживает факт более яркого ответа растений, трансформированных геном *psl*, в сравнении с растениями, экспрессирующими *rapA1*, на присутствие в ризосфере ризобий, узнающих продукты этих генов. Ранее роль глутатиона во взаимодействиях между растениями и микробами преимущественно изучалась в рамках бобово-ризобияльного и микоризного симбиозов, оставляя без внимания

мания искусственные симбиотические системы. Совокупность полученных данных расширяют наши познания о роли глутатиона в реализации возможного симбиотического взаимодействия между трансгенными растениями и микросимбионтами. Предложенный инструментарий также, на наш взгляд, может оказаться эффективным для анализа искусственных симбиотических систем при токсическом воздействии тяжелых металлов или влияния фитопатогенов.

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

Работа была выполнена с привлечением приборного парка РЦКП “Агидель” УФИЦ РАН и УНУ “Кодинк” УФИЦ РАН в рамках госзадания (тема №АААА-А21-121011990120-7) при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований 18-34-20004.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kuźniak E., Skłodowska M. Differential Implication of glutathione, glutathione-metabolizing enzymes and ascorbate in tomato resistance to *Pseudomonas syringae* // J. Phytopathol. 2004. V. 152. P. 529. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2004.00884.x>
2. Harrison J., Jamet A., Muglia C.I., Van de Sype G., Aguilar O.M., Puppo A., Frendo P. Glutathione plays a fundamental role in growth and symbiotic capacity of *Sinorhizobium meliloti* // J. Bacteriol. 2005. V. 187. P. 168. <https://doi.org/10.1128/JB.187.1.168-174.2005>
3. Frendo P., Harrison J., Norman C., Jimenez M.J.H., Van de Sype G., Gilabert A., Puppo A. Glutathione and homoglutathione play a critical role in the nodulation process of *Medicago truncatula* // Mol. Plant Microbe Interact. 2005. V. 18. P. 254. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-0254>
4. Hossain M. A., Mostofa M. G., Diaz-Vivancos P., Burritt D.J., Fujita M., Tran L.S. P. Glutathione in Plant Growth, Development, and Stress Tolerance / Eds. New York: Springer International Publishing. 2017. 421 p.
5. Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S., Han Y., Neukermans J., Marquez-Garcia B., Queval G., Foyer C. H. Glutathione in plants: an integrated overview // Plant Cell Environ. 2012. V. 35. P. 454. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02400.x>
6. Lyoshina L. Cellular and molecular - genetic mechanisms of symbiosis and associative interaction of microorganisms with plants in rhizosphere // Biopolymers and Cell. 2009. V. 25. P. 27. <https://doi.org/10.7124/bc.0007C7>
7. Hérouart D., Baudouin E., Frendo P., Harrison J., Santos R., Jamet A., Van de Sype Gh., Touati D., Puppo A. Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: a key role in the establishment of the legume – Rhizobium symbiosis? // Plant Physiol. Biochem. 2002. V. 40. P. 619. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01415-8](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01415-8)
8. Вершинина З.Р., Благова Д.К., Нигматуллина Л.Р., Лавина А.М., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Ассоциативный симбиоз трансгенных томатов с ризобиями повышает устойчивость растений к *Fusarium oxysporum f. spycopersici* // Биотехнология. 2015. № 3. С. 42.
9. Вершинина З.Р., Хакимова Л.Р., Лавина А.М., Каримова Л.Р., Федяев В.В., Баймиев Ал.Х., Баймиев Ал.Х. Взаимодействие томатов (*Solanum lycopersicum* L.), трансформированных *rapAl*, с бактериями *Pseudomonas* sp. 102, устойчивыми к высоким концентрациям кадмия, как основа эффективной симбиотической системы для фиторемедиации // Биотехнология. 2019. Т. 35. С. 38. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-2-38-48>
10. Liu Y.S., Geng J.C., Sha X.Y., Zhao Y.X., Hu T.M., Yang P.Z. Effect of rhizobium symbiosis on low-temperature tolerance and antioxidant response in alfalfa (*Medicago sativa* L.) // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. P. 538. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00538>
11. Morales M., Munné-Bosch S. Malondialdehyde: Facts and artifacts // Plant physiol. 2019. V. 180. P. 1246. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00405>
12. Вершинина З.Р., Чубукова О.В., Никоноров Ю.М., Хакимова Л.Р., Лавина А.М., Каримова Л.Р., Баймиев Ал.Х., Баймиев Ал.Х. Влияние сверхэкспрессии гена *rosR* на образование биопленок бактериями *Rhizobium leguminosarum* // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 191. <https://doi.org/10.31857/S0026365621020154>
13. Баймиев Ал.Х., Ямиданов Р.С., Матниязов Р.Т., Благова Д.К., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Получение флуоресцентно меченых штаммов клубеньковых бактерий дикорастущих бобовых для их детекции *in vivo* и *in vitro* // Молекулярная биология. 2011. Т. 45. С. 984.
14. Murashige T., Skoog F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
15. Hissin P.J., Hilf R.A. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues // Anal. Biochem. 1976. P. 214. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90326-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90326-2)
16. Масленникова Д.Р., Плотников А.А., Шакирова Ф.М. Сравнительный анализ физиологического действия оксида азота и 6-бензиламинопурина на состояние компонентов глутатионового комплекса в корнях проростков пшеницы // Агрохимия. 2019. № 3. С. 37. <https://doi.org/10.1134/S0002188119030104>
17. Bradford M.M. A rapid and sensitive methods for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // Anal. Biochem. 1976. P. 248. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
18. Garcia-Fraile P., Carro L., Robledo M., Ramirez-Bahena M.H., Flores-Felix J.D., Fernandez M.T., Mateos P.F., Rivas R., Igual J.M., Martinez-Molina E., Peix A. Velázquez, E. Rhizobium promotes non – legumes growth and quality in several production steps: towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for

- humans // PLoS One. 2012. V. 7. e38122.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038122>
19. Вершинина З.Р., Баймиев А.Х., Чемерис А.В. Симбиотические реакции корней облепихи (*Hippophae hamnoides* L.) трансгенных по гену лектина гороха посевного // Физиология растений. 2010. Т. 57. С. 108.
  20. Vershinina Z.R., Baymiev A.K., Blagova D.K., Chubukova O.V., Baymiev A.K., Chemeris A.V. Artificial colonization of non-symbiotic plants roots with the use of lectins // Symbiosis. 2012. V. 56. P. 25.  
<https://doi.org/10.1007/s13199-012-0156-4>
  21. Чубукова О.В., Баймиев А.Х., Вершинина З.Р., Баймиев А.Х. Лектин козлятника восточного как инструмент для создания ассоциаций между культурными растениями и полезными бактериями // Биомика. 2018. Т. 10. С. 400.
  22. Хакимова Л.Р., Лавина А.М., Вершинина З.Р., Баймиев А.Х. Использование штаммов – продуцентов адгезина RapA1 из *Rhizobium leguminosarum* для создания бинарных биоудобрений // Прикладная биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. С. 400.  
<https://doi.org/10.7868/S0555109917040080>
  23. Hernández J.A., Barba-Espín G., Diaz-Vivancos P. Glutathione-mediated biotic stress tolerance in plants // In Glutathione in plant growth, development, and stress tolerance / Eds. Hossain M. A., Mostofa M. G., Diaz-Vivancos P., Burritt D. J., Fujita M., Tran L. S. P. New York: Springer International Publishing. 2017. P. 309.
  24. Иванова К.А., Цыганов В.Е. Антиоксидантная система защиты в симбиотических клубеньках бобовых растений // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т. 52. С. 878.
  25. Liao D., Sun X., Wang N., Song F., Liang Y. Tomato LysM receptor – like kinase SILYK12 is involved in arbuscular mycorrhizal symbiosis // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. P. 1004.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01004>
  26. Staehelin C., Granado J., Müller J., Wiemken A., Mellor R.B., Felix G., Regenass M., Broughton W.J., Boller T. Perception of Rhizobium nodulation factors by tomato cells and inactivation by root chitinases // Prot. Nat. Acad. Sci. U S A. 1994. V. 91. P. 2196.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.91.6.2196>
  27. Овцына А.О., Тихонович И.А. Nod факторы ризобий – новые регуляторы роста растений // Российский химический журнал. 1999. Т. 43. № 5. С. 81.
  28. Puppo A., Pauly N., Boscardi A., Mandon K., Brouquisse R. Hydrogen peroxide and nitric oxide: key regulators of the legume – Rhizobium and mycorrhizal symbioses // Antioxid Redox Signal. 2013. V. 18. P. 2202.  
<https://doi.org/10.1089/ars.2012.5136>
  29. Cheng G., Karunakaran R., East A.K., Munoz-Azcarate O., Poole P. S. Glutathione affects the transport activity of Rhizobium leguminosarum 3841 and is essential for efficient nodulation // FEMS Microbiol. Lett. 2017. V. 364.  
<https://doi.org/10.1093/femsle/fnx045>

УДК 581.1

## ВОЗРАСТНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЛИСТЬЕВ ТОМАТА (*Solanum lycopersicum* L.) К КРУГЛОСУТОЧНОМУ ОСВЕЩЕНИЮ

© 2021 г. Т. Г. Шибаева<sup>а</sup>, \*, А. В. Мамаев<sup>а</sup>, Е. Г. Шерудило<sup>а</sup>, Е. Н. Икконен<sup>а</sup>, А. Ф. Титов<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук,  
Федеральный исследовательский центр Карельский научный центр Российской академии наук, Петрозаводск, Россия

\*e-mail: shibaeva@krc.karelia.ru

Поступила в редакцию 28.10.2020 г.

После доработки 08.11.2020 г.

Принята к публикации 16.11.2020 г.

На растениях томата (*Solanum lycopersicum* L.), который является одной из наиболее чувствительных к круглосуточному освещению (КО) культур, изучали возрастную изменчивость в чувствительности листьев к КО. Установлено, что листья, которые подвергались КО, начиная с лаг-фазы, через 2 недели имели выраженные признаки хлороза (содержание хлорофилла снизилось на 30%) и характеризовались низкими значениями  $F_v/F_m$ ,  $\Phi_{II}$ , уменьшением скорости фотосинтеза и увеличением относительного выхода электролитов. В отличие от этого листья, прошедшие раннее развитие (лаг-фазу) в нормальных световых условиях (16 ч фотопериод) и подвергавшиеся КО уже в лог-фазе, оказались менее чувствительны к КО. Содержание хлорофилла, скорость фотосинтеза и относительный выход электролитов (ОВЭ) у них были на уровне листьев, выросших при 16 ч фотопериоде, но при этом у них отмечено увеличение активности антиоксидантных ферментов – каталазы, аскорбат-пероксидазы и гваякол-пероксидазы. На основании полученных данных сделан вывод, что возрастная изменчивость чувствительности листьев к КО связана с разной степенью активности компонентов антиоксидантной системы. При этом более взрослые растения в целом менее чувствительны к КО, чем более молодые.

**Ключевые слова:** *Solanum lycopersicum*, фотопериод, круглосуточное освещение, хлороз, рост листа, пигменты, антиоксидантные ферменты

DOI: 10.31857/S0015330321040151

### ВВЕДЕНИЕ

В последние годы возрос интерес к использованию круглосуточного освещения (КО) в условиях защищенного грунта и, особенно, в закрытых системах на фабриках растений (PFAL – plant factories with artificial light), получивших широкое применение в целом ряде стран (США, Япония, Китай, Корея и др.) [1]. Биомасса растения при прочих оптимальных условиях выращивания в значительной степени определяется общим количеством поглощенного света, которое зависит от интенсивности освещения и фотопериода. Поэтому КО может увеличивать биомассу растения и урожай, если оно не вызывает повреждений листьев [2, 3]. Однако, у многих видов растений в

условиях длительных фотопериодов развивается межжилковый хлороз или некроз. В частности, симптомы светового повреждения листьев при КО отмечены у таких культур как томат, баклажан, сладкий перец, огурец и некоторых других [2–4]. Причем не только отдельные виды, но и сорта, например, листового салата, могут заметно различаться по своей чувствительности к КО. Тем не менее, применение длинных фотопериодов, в том числе КО, с относительно низкой плотностью потока фотонов экономически выгодно, так как снижает начальные и операционные затраты [5, 6]. Перераспределение использования электроэнергии для освещения с дневного времени на периоды наименьшей нагрузки в ночное время позволяет снизить стоимость потребляемой электроэнергии, так как во многих регионах мира ночной тариф на электроэнергию ниже дневного (вплоть до 50%) [7]. К тому же тепло, выделяемое светильниками, помогает обеспечивать потребности растений в тепле в ночное время [8]. Ис-

**Сокращения:** АОС – антиоксидантная система, АПО – аскорбатпероксидаза, КАТ – каталаза, КО – круглосуточное освещение, ОВЭ – относительный выход электролитов, ПО – гваякол-пероксидаза, ЭИВ – эффективность использования воды.

пользование динамического контроля температуры позволяет на сегодняшний день применение КО для таких чувствительных культур как огурец, томат и сладкий перец в теплицах с дополнительным освещением [7, 9–11] и при этом продолжается поиск более эффективных способов выращивания [12].

Несмотря на применение КО на практике, вопрос о механизмах чувствительности и адаптации растений к непрерывному освещению остается открытым. Предложенные на сегодняшний день гипотезы, объясняющие реакцию растений на КО и предполагающие те или иные механизмы устойчивости, пока не находят соответствующей экспериментальной поддержки. Среди них рассматриваются такие, как гипераккумуляция крахмала, постоянное фотоокислительное воздействие, сигнальное воздействие на фоторецепторы, несоответствие между частотой внутренних (циркадных) биоритмов и внешним циклом свет/темнота (циркадная асинхрония) [3, 13–15]. Высказано также предположение, что фотоповреждение листьев при КО является результатом несбалансированного возбуждения ФС I и ФС II [16].

Анализ литературы показывает, что при рассмотрении и сопоставлении данных, полученных разными авторами в работах по изучению реакции растений на КО, не учитывается возраст листа и возраст растений, выбранных в качестве объектов исследований. Время начала воздействия КО может совпадать с разными фазами роста листьев и разными этапами онтогенеза растения. Вопросы влияния КО на онтогенез растений не изучались глубоко, хотя КО широко использовали в селекционно-генетических исследованиях, вызывая ускорение развития некоторых видов растений [17]. Возрастная же изменчивость в чувствительности листьев и растений к постоянному действию света по сути не изучалась и не обсуждалась со времени упоминания о возможности таковой в работе W.S. Hillman [18]. Отсутствие понимания онтогенетических особенностей в реакции листа и растения в целом на КО затрудняет выявление механизмов устойчивости и адаптации растений к КО. Это же является одной из причин имеющихся в литературе противоречивых суждений относительно успешного или неуспешного культивирования растений в условиях длительных фотопериодов, а также процессов, участвующих в реакции растений на КО.

Учитывая все вышесказанное, нами была поставлена задача изучить у чувствительного к КО растения томата влияние на чувствительность листьев томата к КО а) фазы роста листа в момент начала действия КО, б) порядкового номера листа и в) возраста растения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили растения томата (*Solanum lycopersicum* L., гибрид Верлиока плюс F1). Семена проращивали в течение 2 сут в чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной дистиллированной водой, в темноте при температуре 28°C. Проклюнувшиеся семена высаживали в пластиковые контейнеры 7 × 7 см с песком, и выращивали растения в камерах искусственного климата ("Vöth", Германия) при фотопериоде 16 ч, ФАР 250 мкмоль/(м<sup>2</sup> с), температуре 23°C, влажности воздуха 70% при поливе полным питательным раствором (в мг/л: 226 N, 55 P, 370 K, 180 Ca, 40 Mg, 45 S, 17 Na, 52 Cl, 2.5 Fe, 0.6 Mn, 0.35 B; 0.3 Zn, 0.15 Cu и 0.05 Mo; pH = 6.2–6.4).

Растения в возрасте 14, 18 или 30 сут от посадки переставляли в камеры с КО (фотопериодом 24 ч) (рис. 1б). Контрольные растения продолжали расти в условиях 16 ч фотопериода.

Для определения фаз роста листьев в момент переключения светового режима на КО использовали кривые роста листьев томата в условиях 16 ч фотопериода. Схематически кривая роста представлена на рис. 1а. В момент переключения на условия КО у растений в возрасте 14 сут (рис. 1б-А) листья с порядковыми номерами 1 и 2 находились в лог-фазе роста (длина более 3 см), а листья, начиная с третьего, были в лаг-фазе роста (лаг-1 – длина менее 1 см, лаг 2 – длина менее 2.5 – 3 см) (рис. 1). У растений в возрасте 18 сут в лаг-фазе роста (длина менее 3 см) находились листья, начиная с пятого (рис. 1б-Б). У растений в возрасте 30 сут первые 7–8 листьев были в лог-фазе роста (длина более 3 см) (1б-В). В качестве контроля в каждом случае использовали листья соответствующего порядкового номера, чтобы избежать различий, связанных с разным возрастом листа.

Величину LMA (от leaf mass per area) рассчитывали как отношение сухой массы высечек листовой пластинки к их площади. Из каждого листа сверлом с диаметром 8 мм вырезали по 8 высечек. Сухую массу высечек листьев определяли после высушивания до постоянного веса при 105°C.

Общее содержание хлорофиллов *a* и *b* определяли с помощью спектрофотометра СФ-2000 ("Спектр", Россия), экстрагируя их 96% этиловым спиртом и рассчитывая по известным формулам [19]. Для контроля за динамикой содержания хлорофилла проводили экспресс-анализ с помощью измерителя уровня хлорофилла SPAD 502 Plus ("Konica Minolta", Osaka, Япония). Возможность использования измерителя уровня хлорофилла SPAD 502 Plus для быстрого и неdestructивного определения содержания хлорофилла в листьях с межжилковым хлорозом показана нами ранее [20].

Измерения параметров флуоресценции хлорофилла проводили с использованием флуориметра с импульсно-модулированным освещением (MINI-

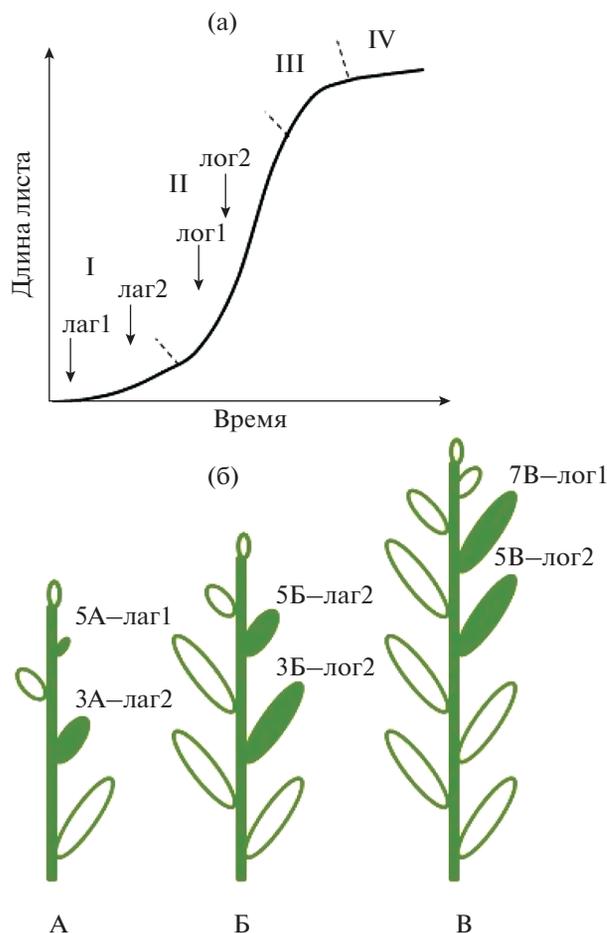
РАМ, “Walz”, Германия). Определяли потенциальный квантовый выход фотохимической активности ФС II ( $F_v/F_m$ ) после 20-минутной темновой адаптации листьев и реальный квантовый выход фотохимической активности ФС II ( $\phi_{II}$ ) (для контрольных растений после 30-минутной световой адаптации листьев), который рассчитывали как  $\phi_{II} = \Delta F/F_m' = (F_m' - F)/F_m'$  [21].

Видимый фотосинтез ( $A_n$ ) и транспирацию листьев ( $T_r$ ) измеряли с помощью портативной фотосинтетической системы HCM-1000 (“Walz”, Германия) при температуре листа 23°C и при ФАР 300 и 1000 мкмоль/(м<sup>2</sup> с). Все измерения газообмена начинали не ранее чем через 2 ч после начала светового периода в варианте контроля. Эффективность использования воды (ЭИВ) была рассчитана как отношение  $A_n$  к  $T_r$ .

Проницаемость мембран оценивали по относительному выходу электролитов (ОВЭ) из тканей листа. Для этого по 10 высечек из листьев диаметром 4 мм промывали дистиллированной водой для удаления клеточного сока со срезов, обсушивали фильтровальной бумагой и заливали 10 мл дистиллированной воды. Электропроводность раствора (E1) определяли после 2 ч экспозиции пробирок с высечками на шейкере при температуре 23°C с помощью кондуктометра Эксперт-002 с датчиком для микрообъемов УЭП-П-С (“Эко-никс-Эксперт”, Россия). Затем пробирки с растительным материалом доводили до кипения, остужали до комнатной температуры и определяли полный выход электролитов (E2) по электропроводности раствора после разрушения мембран кипячением. ОВЭ рассчитывали в процентах от полного по формуле:  $ОВЭ = 100 \times E1/E2$ .

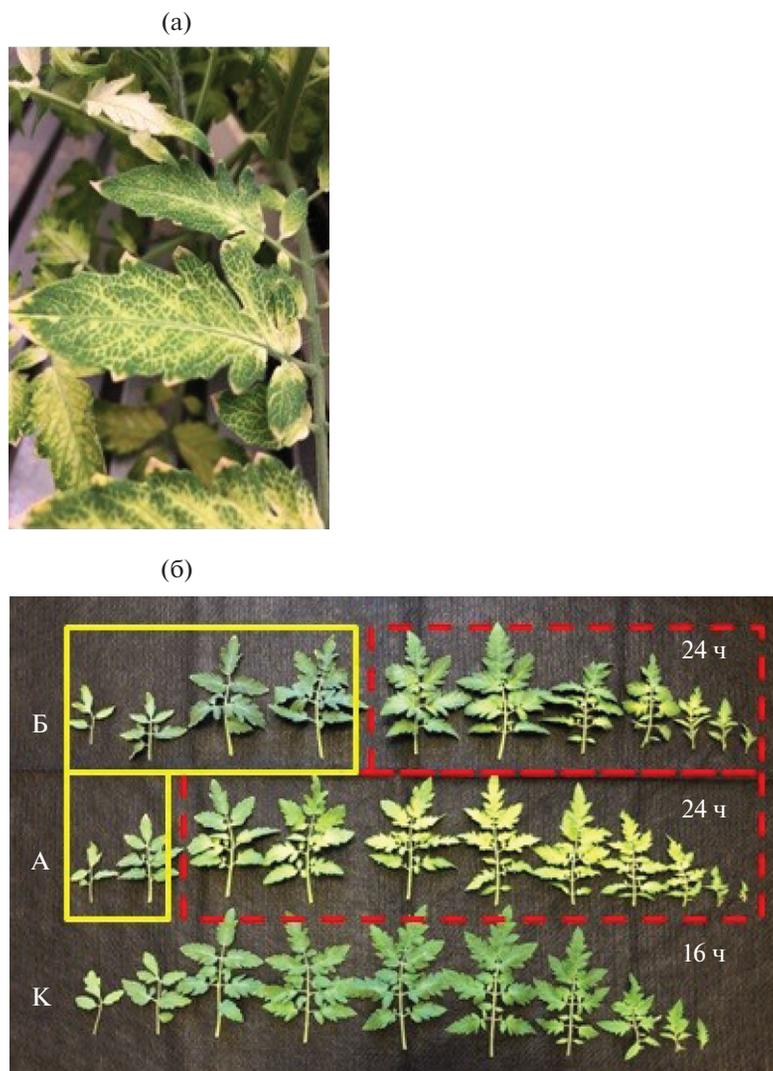
Интенсивность ПОЛ оценивали по содержанию МДА, которое определяли по методике, основанной на образовании триметинового комплекса с максимумом поглощения 532 нм при взаимодействии данных соединений с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Листья (0.1 г) растирали в 2 мл 20% ТХУ. Гомогенат центрифугировали при 15000 g в течение 10 мин; 1 мл надосадочной жидкости смешивали с 1 мл 20% ТХУ, содержащей 0.5% ТБК. Смесь нагревали в течение 30 мин при 95°C и затем центрифугировали 5 мин при 10000 g. Концентрацию МДА определяли спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность при 532 нм и неспецифичное поглощение при 600 нм. Для расчета содержания МДА использовали коэффициент молярной экстинкции равный 155 мМ<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>. Концентрацию МДА выражали в мкмоль/г сухой массы листьев.

В листьях также анализировали активность антиоксидантных ферментов: каталазы (КАТ, КФ 1.11.1.6), аскорбатпероксидазы (АПО, КФ 1.11.1.11) и гваякол-пероксидазы (ПО, КФ 1.11.1.7).



**Рис. 1.** а) Кривая роста листа *Solanum lycopersicum*. Фазы роста листа: I – лаг-фаза, II – фаза логарифмического роста (лог-фаза), III – фаза замедления скорости роста, IV – стационарная. Стрелками указан момент перехода на круглосуточное освещение (КО). б) Схема постановки опыта. Растения подвергались действию КО в возрасте 14 сут (А), 18 сут (Б) и 30 сут (В) от посадки. Анализировали 3, 5 и 7 листья (полная штриховка), которые находились на разных фазах роста в момент перехода на КО: 3А-лаг2 – 3 лист в середине лаг-фазы; 5А-лаг1 – 5 лист в начале лаг-фазы; 3Б-лог2 – 3 лист в середине лог-фазы; 5Б-лаг2 – 5 лист в середине лаг-фазы; 5В-лог2 – 5 лист в середине лог-фазы; 7В-лог1 – 7 лист в начале лог-фазы.

С этой целью листья гомогенизировали в 50 мМ фосфатном буфере (рН 7.8). Гомогенат центрифугировали при 15000 g в течение 10 мин при 4°C; в супернатанте определяли активности ферментов. Активность КАТ определяли по ферментативному разложению H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при 240 нм. Активность АПО определяли спектрофотометрически в присутствии 0.5 мМ аскорбиновой кислоты и 0.5 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> по снижению оптической плотности при 290 нм. Анализ активности ПО основывался на окислении гваякола в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Реакционная среда содержала 2.5 мл 50 мМ калий-фосфатного буфера (рН 6.1), 1 мл 1% перекиси водорода, 1 мл



**Рис. 2.** а) Межжилковый хлороз листьев *Solanum lycopersicum*, вызванный круглосуточным освещением. б) Листья контрольных растений (К), выращенных в условиях 16 ч фотопериода, и растений, помещенных в условия круглосуточного освещения, в возрасте 14 сут (А) или 18 сут (Б) (см. рис. 1). Пунктирным контуром выделены листья, подвергавшиеся круглосуточному освещению, начиная с лаг-фазы, сплошным — с лог-фазы.

1% гваякола и 10 мкл ферментативного препарата. Измеряли оптическую плотность при 470 нм. Активность ферментов рассчитывали на 1 г сухой массы листьев, а удельную активность — на 1 мг белка. Общее содержание белка определяли методом Бредфорд, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Визуальную оценку состояния листьев (проявления хлороза или некроза) (рис. 2а) и неструктивные измерения (содержание хлорофилла в у.е. SPAD,  $F_v/F_m$  и  $\Phi_{II}$ ) проводили каждые 3–4 дня. Остальные измерения были выполнены через 3 недели от начала действия КО на растения.

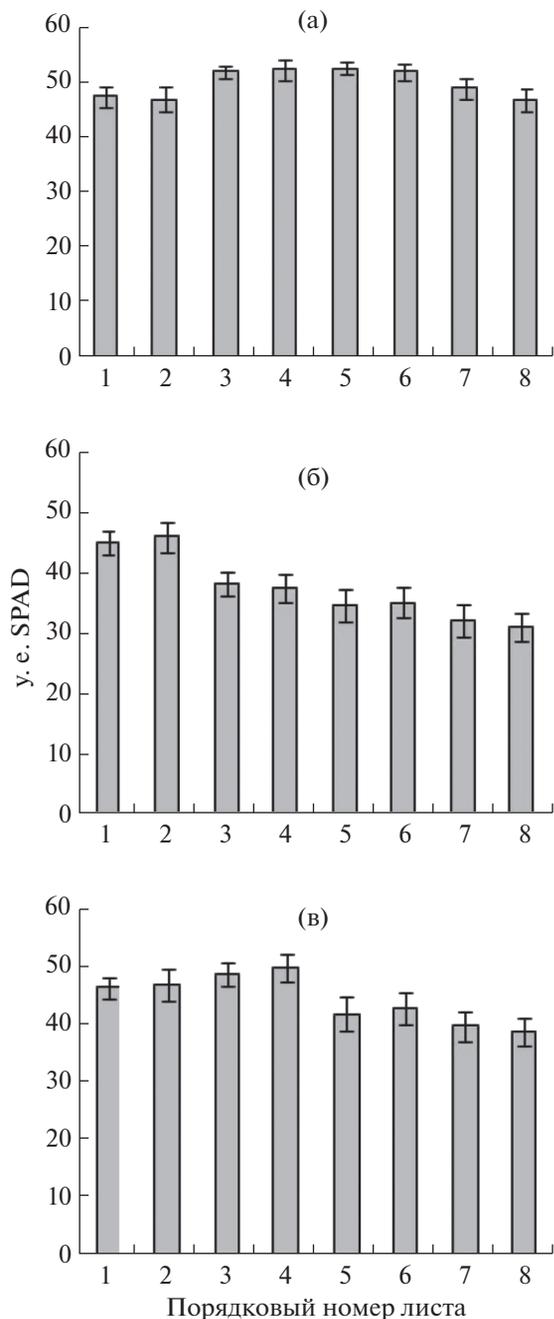
Каждый опыт повторяли два раза. На рисунках представлены средние значения ( $n \geq 6$ ) и их стандартные ошибки. Достоверность различий между

средними значениями устанавливалась с помощью дисперсионного анализа с использованием программного обеспечения Statistica (v. 8.0.550.0, “StatSoft, Inc.”). Разницу между средними значениями считали значимой при  $P < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

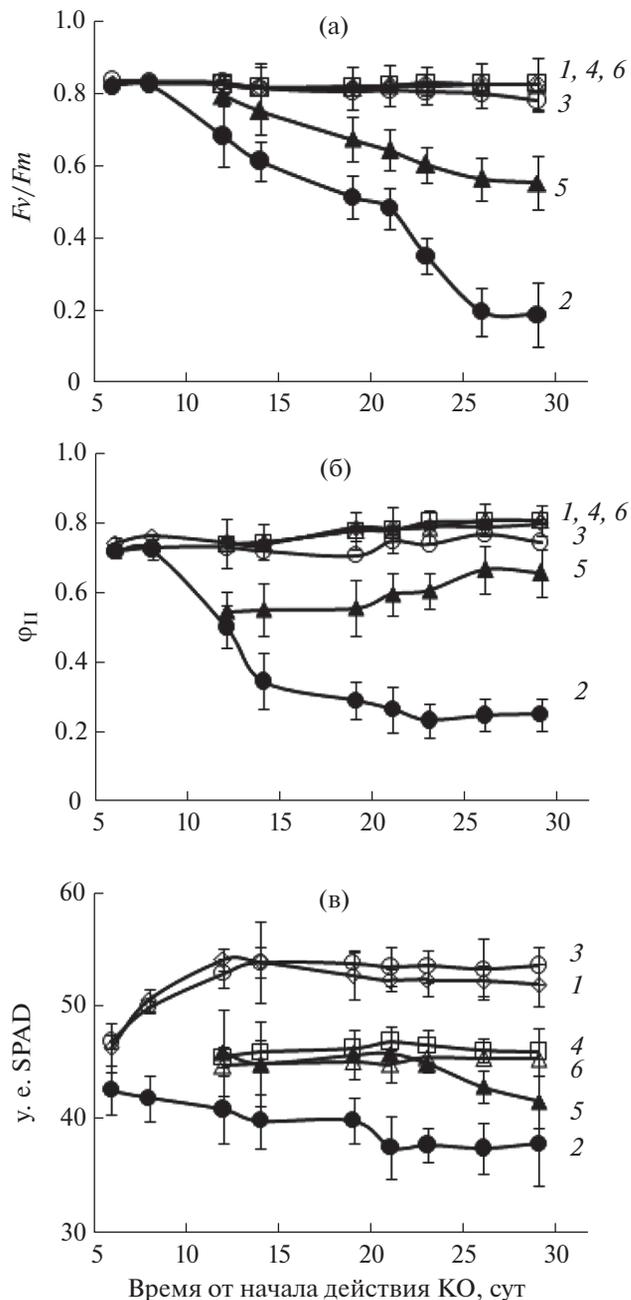
### *Влияние фазы роста листа*

У растений, первоначально находящихся в условиях 16 ч фотопериода, а затем помещенных в условия 24 ч фотопериода, уже через неделю зафиксировано снижение содержания хлорофилла в листьях, а также снижение потенциального ( $F_v/F_m$ ) и реального ( $\Phi_{II}$ ) квантового выхода фотохимической активности ФСII по сравнению с контроль-



**Рис. 3.** Содержание хлорофилла (у.е. SPAD) в листьях контрольных растений (а), выращенных в условиях 16 ч фотопериода и растений, помещенных в условия круглосуточного освещения, в возрасте 14 сут (б) или 18 сут (в).

ными растениями (рис. 3, 4). Однако, эти изменения наблюдались не у всех листьев. Так, у растений, подверженных действию КО в возрасте 14 дней (рис. 1б-А), указанные выше признаки, а позже и хлороз (рис. 2А), проявились у листьев с порядковым номером 3 и выше (рис. 2б-А, 3), которые в момент начала действия КО находились в лаг-фазе роста. У растений, подвергшихся действию КО



**Рис. 4.** Потенциальный ( $F_v/F_m$ ) и реальный ( $\Phi_{II}$ ) квантовый выход фотохимической активности ФС II и относительное содержание хлорофилла (у.е. SPAD) в листьях растений, выращенных в условиях 16 ч фотопериода (1 – 3 лист, 4 – 5 лист) или подвергавшихся действию 24 ч фотопериода, начиная с лаг-фазы (2 – лист 3А-лаг2, 5 – 5Б-лаг2) или лог-фазы (3 – 3Б-лог2, 6 – 5В-лог2).

с 18 сут, поврежденными оказались листья с пятого и выше (рис. 2б-Б, 3). У растений этого возраста в момент начала действия КО листья с порядковым номером пять и выше находились в лаг-фазе роста.

Для оценки влияния фазы роста листа на чувствительность к КО изучили реакцию листьев,

**Таблица 1.** Физиолого-биохимические показатели листьев, испытывавших действие круглосуточного освещения в течение 3 недель, начиная с лаг- или лог-фазы роста (в % к контролю).

Показатель	3 лист		5 лист	
	3А-лаг2	3Б-лог2	5Б-лаг2	5В-лог2
Хл ( $a + b$ ), мг/г сух. массы	75*	96	79*	98
$A_{n\ 300}$ , мкмоль $\text{CO}_2/(\text{м}^2 \text{ с})$	30*	105	56*	103
$A_{n\ 1000}$ , мкмоль $\text{CO}_2/(\text{м}^2 \text{ с})$	51*	71 *	68*	98
ЭИВ, мкмоль $\text{CO}_2/\text{ммоль } \text{H}_2\text{O}$	54*	102	68*	101
LMA, мг/см <sup>2</sup>	92	119 *	107	207*
ОВЭ, %	242*	90	145 *	101
МДА, мкмоль/ г сух массы	142*	120 *	158 *	108
КАТ, мкмоль $\text{H}_2\text{O}_2/(\text{мг белка мин})$	46*	127*	109	130*
АПО мкмоль/(мг белка мин)	114	146*	107	121*
ПО мкмоль/(мг белка мин)	87	151*	154*	486*

Примечание: Контроль — листья соответствующего порядкового номера в условиях 16 ч фотопериода. \* — значимые различия с контролем. Хл — хлорофилл. Показатели в контрольных растениях приняты за 100%. Абсолютные значения контрольных образцов для 3 листа: хл ( $a + b$ ) — 12.8 мг/г сухого веса,  $A_{n\ 1000}$  — 10.7 мкмоль  $\text{CO}_2/(\text{м}^2 \text{ с})$ ,  $A_{n\ 300}$  — 6.0 мкмоль  $\text{CO}_2/(\text{м}^2 \text{ с})$ , ЭИВ — 7.48 мкмоль  $\text{CO}_2/\text{ммоль } \text{H}_2\text{O}$ , LMA — 2.6 мг/см<sup>2</sup>, ОВЭ — 22.4%, МДА — 253 мкмоль/г сухого веса, КАТ — 2.6 мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2/(\text{мг белка мин})$ , АПО — 35 мкмоль/(мг белка мин), ПО — 47 мкмоль/(мг белка мин); для 5 листа: хл ( $a + b$ ) — 11.7 мг/г сухого веса,  $A_{n\ 300}$  — 6.3 мкмоль  $\text{CO}_2/(\text{м}^2 \text{ с})$ ,  $A_{n\ 1000}$  — 8.2 мкмоль  $\text{CO}_2/(\text{м}^2 \text{ с})$ , ЭИВ — 9.28 мкмоль  $\text{CO}_2/\text{ммоль } \text{H}_2\text{O}$ , LMA — 1.4 мг/см<sup>2</sup>, ОВЭ — 21.5%, МДА — 153 мкмоль/г сухого веса, КАТ — 4.6 мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2/(\text{мг белка мин})$ , АПО — 43 мкмоль/(мг белка мин), ПО — 35 мкмоль/(мг белка мин).

подвергавшиеся действию КО, начиная с лаг-фазы или лог-фазы. Использовали листья разного порядка — третий и пятый. Таким образом, сравнивали листья 3А-лаг2 и 3Б-лог2, а также 5Б-лаг2 и 5В-лог2, т.е. листья одного порядкового номера, находящиеся на разных фазах роста в момент начала действия КО. Результаты показали, что и третий, и пятый листья, испытывавшие действие КО, начиная с лаг-фазы (3А-лаг2 и 5Б-лаг2), имели более низкие значения содержания хлорофилла (рис. 4в, табл. 1) и показателей флуоресценции хлорофилла ( $F_v/F_m$ ,  $\Phi_{II}$ ) (рис. 4а, б). Интенсивность фотосинтеза у третьего листа была на 70% и 50%, а у пятого листа — на 45 и 30% ниже контроля при ФАР 300 и 1000 мкмоль/(\text{м}^2 \text{ с}), соответственно (табл. 1). Значения ЭИВ у третьего и пятого листа были ниже контроля на 45 и 30%, соответственно. В то же время у этих листьев были значительно увеличены показатели проницаемости мембран (ОВЭ на 142 и 45%) и ПОЛ (содержание МДА на 42 и 58%) (табл. 1), что свидетельствует о наличии сильного окислительного стресса. У листа 3А-лаг2 отмечено снижение активности КАТ на 54% по сравнению с контролем, а у листа 5Б-лаг2 увеличение активности ПО на 54% (табл. 1).

Третий и пятый листья, которые в момент перехода на КО были в лог-фазе роста (3Б-лог2 и 5В-лог2), по содержанию хлорофилла и динамике

значений  $F_v/F_m$  и  $\Phi_{II}$  не отличались достоверно от контроля (рис. 4, табл. 1). Значения  $A_{n\ 300}$  у третьего и пятого листьев были на уровне контроля, а значения  $A_{n\ 1000}$  у третьего листа на 30% ниже контроля (табл. 1). Значения LMA существенно превосходили контроль — на 19% у третьего листа и на 107% у пятого. У третьего листа отмечено повышение на 20% по сравнению с контролем содержания МДА, тогда как у пятого листа оно было сопоставимо с контролем. По активности антиоксидантных ферментов (КАТ, АПО и ПО) и третий, и пятый лист имели более высокие показатели по сравнению с контролем (табл. 1).

#### Влияние положения листа на растении

Для того чтобы выявить влияние положения листа на растении (порядкового номера) на чувствительность к КО, сравнивали реакцию листьев, которые в начале действия КО находились на одной фазе роста, но имели разный порядковый номер, то есть листья 3А-лаг2 и 5А-лаг1, а также 5В-лог2 и 7В-лог1 (рис. 1б).

Сравнение 3-го и 5-го листа, находящихся в лаг-фазе в момент начала действия КО (листья 3А-лаг2 и 5А-лаг1), показало, что с течением времени содержание хлорофилла и значения  $F_v/F_m$  и

$\Phi_{II}$  у них значительно снижались по сравнению с контролем (рис. 5, табл. 2). У третьего листа значения  $A_n 300$ ,  $A_n 1000$  и ЭИВ были ниже контрольных на 50–70%, тогда как у пятого листа составляли всего 4–7% от контрольных значений (табл. 2). Значения ОВЭ превосходили контрольные на 142% и 67% для листьев 3А-лаг2 и 5А-лаг1, соответственно. У третьего листа содержание МДА было на 42% выше по сравнению с контролем. У третьего листа на 54% была снижена активность КАТ, а у пятого листа активность всех ферментов была значительно снижена – КАТ – на 48%, АПО – на 60%, ПО – на 66% (табл. 2).

При сравнении пятого и седьмого листьев, которые были в лог-фазе роста в момент начала действия КО, видно, что по содержанию хлорофилла, показателям флуоресценции хлорофилла, интенсивности фотосинтеза, ЭИВ, ОВЭ и МДА они не отличались достоверно от контроля (рис. 5, табл. 2). При этом значения ЛМА у листьев 5В-лог2 и 7В-лог1 превышали контрольные значения на 107% и 80%, соответственно. При этом значения активности ферментов КАТ и АПО у обоих листьев превышали контрольные значения на 20–30%, а ПО – более чем в 2–3 раза (табл. 2).

У листьев, испытавших действие КО, начиная с лаг-фазы роста, степень хлороза усиливалась с увеличением номера листа (рис. 2б, 3).

#### Влияние возраста растения

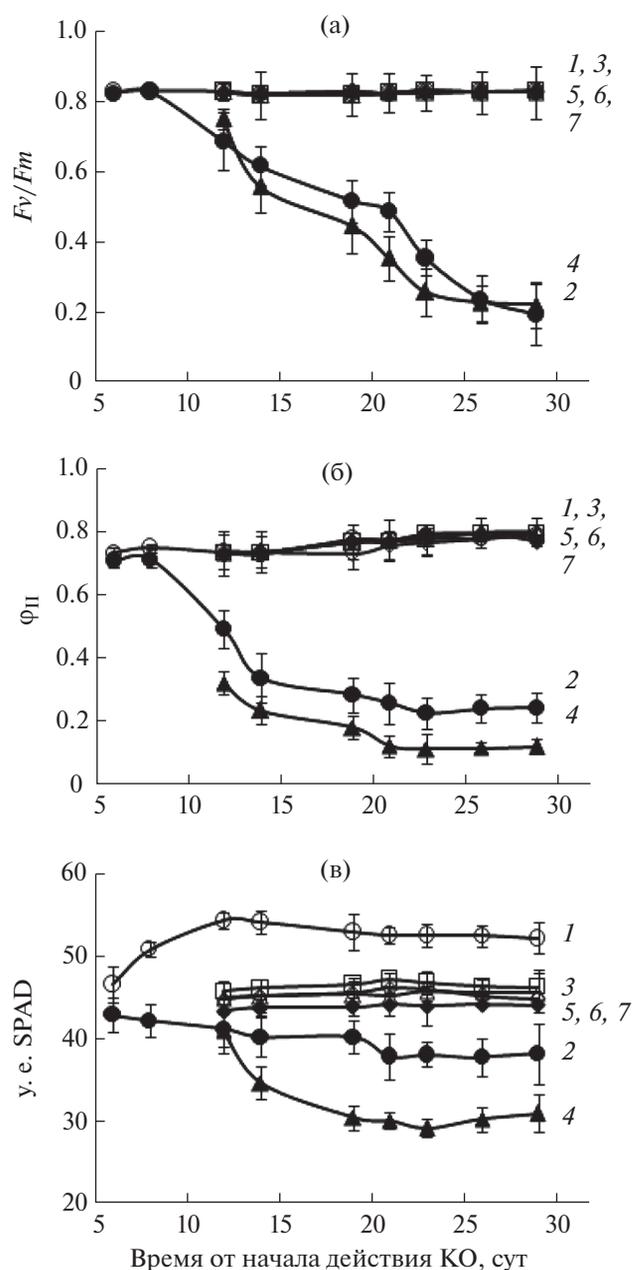
Для оценки влияния возраста растения на чувствительность к КО сравнивали реакцию листьев, находящихся на одинаковой фазе роста у растений, которые в начале действия КО имели разный возраст. Для этого сравнивали листья 3А-лаг2 и 5Б-лаг2, а также 3Б-лог2 и 5В-лог2 (рис. 1б).

Большинство изученных показателей у листьев 3А-лаг2 и 5Б-лаг2 были ниже контрольных значений (табл. 1, рис. 4), однако показатели флуоресценции хлорофилла (рис. 4) и интенсивность фотосинтеза (табл. 1) были значительно выше у листьев 5Б-лаг2. В то же время у листьев 5Б-лаг2 были значительно ниже, чем у листьев 3А-лаг2, значения ОВЭ, при этом в 2 раза выше активность КАТ и ПО (табл. 1).

Листья 3Б-лог2 и 5В-лог2 по показателям  $F_v/F_m$  и  $\Phi_{II}$ , содержанию хлорофилла,  $A_n 300$ , ЭИВ не отличались от контроля, однако листья 3Б-лог2 имели на 30% ниже значения  $A_n 1000$  по сравнению с листьями 5В-лог2, а значения МДА у них были несколько выше (табл. 1). По активности ПО листья 5В-лог2 в 3 раза превосходили листья 3Б-лог2.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

В ряде проведенных экспериментов мы наблюдали, что листья томата обладают разной чув-



**Рис. 5.** Потенциальный ( $F_v/F_m$ ) и реальный ( $\Phi_{II}$ ) квантовый выход фотохимической активности ФС II и относительное содержание хлорофилла (y.e. SPAD) в листьях растений, выращенных в условиях 16 ч фотопериода (1 – 3 лист, 3 – 5 лист, 6 – 7 лист) или подвергавшихся действию 24 ч фотопериода (2 – лист 3А-лаг2, 4 – 5А-лаг1, 5 – 5В-лог2, 7 – 7В-лог1).

ствительностью к КО, которую можно оценить с помощью различных физиолого-биохимических показателей. Визуально разная реакция на КО у листьев томата на одном растении отмечалась и ранее [18], однако физиолого-биохимическая оценка этого феномена дана не была. Из полученных нами результатов следует, что фаза роста листа, на которой находится лист в момент начала действия КО

**Таблица 2.** Физиолого-биохимические показатели листьев разного порядка по положению на стебле, испытывавших действие круглосуточного освещения в течение 3 недель (в % к контролю).

Показатель	Лаг-фаза		Лог-фаза	
	3А-лаг2	5А-лаг1	5В-лог2	7В-лог1
Хл ( $a + b$ ), мг/г сухой массы	75*	78*	98	98
$A_n 300$ , мкмоль $\text{CO}_2/(\text{м}^2 \text{ с})$	30*	4*	103	99
$A_n 1000$ , мкмоль $\text{CO}_2/(\text{м}^2 \text{ с})$	51*	4*	98	96
ЭИВ, мкмоль $\text{CO}_2/\text{ммоль H}_2\text{O}$	54*	7*	101	97
LMA, мг/см <sup>2</sup>	92	93	207*	180*
ОВЭ, %	242*	167*	101	105
МДА, мкмоль/г сухой массы	142*	107	108	110
КАТ, мкмоль $\text{H}_2\text{O}_2/(\text{мг белка мин})$	46*	52*	130*	120*
АПО мкмоль/(мг белка мин)	114	40*	121*	125*
ПО мкмоль/(мг белка мин)	87	34*	486*	377*

Примечание: Контроль – листья соответствующего порядкового номера в условиях 16 ч фотопериода. \* – значимые различия с контролем. Хл – хлорофилл. Показатели в контрольных растениях приняты за 100%. Абсолютные значения контрольных образцов для 3 листа: хл ( $a + b$ ) – 12.8 мг/г сухого веса,  $A_n 1000$  – 10.7 мкмоль  $\text{CO}_2/(\text{м}^2 \text{ с})$ ,  $A_n 300$  – 6.0 мкмоль  $\text{CO}_2/(\text{м}^2 \text{ с})$ , ЭИВ – 7.48 мкмоль  $\text{CO}_2/\text{ммоль H}_2\text{O}$ , LMA – 2.6 мг/см<sup>2</sup>, ОВЭ – 22.4%, МДА – 253 мкмоль/г сухого веса, КАТ – 2.6 мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2/(\text{мг белка мин})$ , АПО – 35 мкмоль/(мг белка мин), ПО – 47 мкмоль/(мг белка мин); для 5 листа: хл ( $a + b$ ) – 11.7 мг/г сухого веса,  $A_n 300$  – 6.3 мкмоль ( $\text{м}^2 \text{ с})$ ,  $A_n 1000$  – 8.2 мкмоль ( $\text{м}^2 \text{ с})$ , ЭИВ – 9.28 мкмоль  $\text{CO}_2/\text{ммоль H}_2\text{O}$ , LMA – 1.4 мг/см<sup>2</sup>, ОВЭ – 21.5%, МДА – 153 мкмоль/г сухого веса, КАТ – 4.6 мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2/(\text{мг белка мин})$ , АПО – 43 мкмоль/(мг белка мин), ПО – 35 мкмоль/(мг белка мин); для 7 листа: хл ( $a + b$ ) – 10.9 мг/г сухого веса,  $A_n 1000$  – 8.3 мкмоль  $\text{CO}_2/(\text{м}^2 \text{ с})$ ,  $A_n 300$  – 6.2 мкмоль  $\text{CO}_2/(\text{м}^2 \text{ с})$ , ЭИВ – 9.18 мкмоль  $\text{CO}_2/\text{ммоль H}_2\text{O}$ , LMA – 1.4 мг/см<sup>2</sup>, ОВЭ – 21.1%, МДА – 148 мкмоль/г сухого веса, КАТ – 4.2 мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2/(\text{мг белка мин})$ , АПО – 39 мкмоль/(мг белка мин), ПО – 37 мкмоль/(мг белка мин).

на растение, играет определяющую роль в реакции листа на КО. Так, у листьев, находящихся в момент начала действия КО в лаг-фазе роста, постепенно снижались показатели потенциального и реального выхода фотохимической активности ФС II, интенсивность фотосинтеза, содержание хлорофилла. Вместе с тем у них повышались интенсивность ПОЛ и проницаемость мембран (ОВЭ), что свидетельствует о развитии окислительного стресса. Со временем у таких листьев появлялся межжилковый хлороз. В противоположность, листья, которые в момент начала действия КО были старше и находились в лог-фазе роста, по показателям фотосинтетической активности и содержанию хлорофилла не отличались от контроля, за исключением снижения интенсивности фотосинтеза у третьего листа при насыщающей интенсивности света. Признаков окислительного стресса у них не наблюдалось. Обычно повышение устойчивости растений к избыточному свету связывают с повышением активности механизмов антиоксидантной защиты [22]. В данном случае эти листья имели более высокие показатели активности антиоксидантных ферментов (КАТ, АПО и ПО), что предположительно и явилось причиной отсут-

ствия у них фотоповреждений. Так, активность КАТ, АПО и ПО у третьего листа, подвергнутого действию КО в лог-фазе, была в среднем на 80%, 32 и 64% выше, чем у листа, испытывавшего действие КО, начиная с лаг-фазы роста. А для пятого листа эти значения составляли 21, 14 и 332% соответственно.

Наблюдаемая зависимость чувствительности листа к КО от фазы роста листа не является неожиданной. В литературе, посвященной фотопериодизму, описано достаточно случаев, когда чувствительность растений к фотопериодическому стимулу инициации цветения изменяется в ходе онтогенеза [23]. Известно также, что под фотопериодическим контролем находится не только переход к генеративному развитию, но и такие процессы как, например, рост листьев, способ ветвления, рост корневой системы, накопление и распределение сухого вещества, кушение. Однако, в случае с КО, как показывают наши опыты, реакции листьев и растений противоположны тем, которые наблюдаются при изменении чувствительности к фотопериодическому стимулу. Так, известно, что чувствительность старых и молодых листьев неодинакова, а наиболее чувствительными к изме-

нению фотопериода являются активно растущие листья. Есть и более сложные примеры зависимости от возраста листа. Например, у растений дурнишника (*Xanthium pennsylvanicum*) листья площадью менее 2 см<sup>2</sup> нечувствительны к фотопериодическому стимулу цветения, а максимальная чувствительность зафиксирована у листьев, достигших половины своего окончательного размера. Затем, по мере дальнейшего роста, чувствительность листьев снова снижается [24]. И в этом случае, и в наших экспериментах с КО, наблюдается отсутствие или снижение чувствительности у зрелых листьев. Однако, в случае с восприятием фотопериодического стимула самые молодые листья находятся на преиндуктивной стадии и не способны (не обладают компетенцией) воспринимать стимулирующие сигналы, а под действием КО наиболее сильные повреждения появляются у самых молодых листьев, в то время как растущие и зрелые листья практически не имеют видимых повреждений или они возникают гораздо позже. Известно также, что чувствительность листьев к изменению фотопериода связана и с возрастом растения. Чем старше растение, тем менее продолжительный индуктивный период требуется для перехода к цветению. В случае с действием КО более взрослые растения оказываются менее чувствительными. Это отмечено в наших экспериментах и в более ранних опытах на томате [18] с указанием на то, что наибольшей чувствительностью обладают растения, имеющие 4–7 листьев, а более молодые или взрослые являются менее чувствительными. Мы в своей работе отметили только меньшую степень снижения фотосинтетической активности и развития окислительного стресса у листьев, подвергшихся действию КО в лаг-фазе, на более взрослых растениях. У растений же, которые с самого начала росли в условиях КО, все листья, начиная с первого, имели очень хорошо выраженные признаки фотоповреждения (хлороз, содержание хлорофилла менее 10 у.е. SPAD) (данные не приводятся).

Особо отметим, что в наших опытах мы обнаружили более высокую активность АО ферментов — КАТ, АПО и ПО. Ранее повышение активности КАТ и СОД также отмечалось у растений культурного томата в условиях КО и постоянной температуры [25]. У баклажана в условиях КО резкое увеличение активности СОД, КАТ и ПО происходит уже на второй день [26]. В ряде других работ, в частности проведенных с растениями салата в условиях КО, отмечено более высокое содержание неферментных компонентов антиоксидантной системы (АОС), таких как L-аскорбиновая кислота и глутатион, а также повышенная активность АПО и глутатионредуктазы на фоне значений  $F_v/F_m$  выше 0,8, свидетельствующих об отсутствии фотоокислительных повреждений [1]. Повышение содержания L-аскорбиновой кислоты наблюда-

лось после 48 ч непрерывного действия света [27], что привело авторов к идее краткосрочного (в течение 2 сут) применения КО для увеличения содержания аскорбиновой кислоты перед сбором урожая для производства так называемых функциональных пищевых продуктов (“functional food”) с повышенным антиоксидантным действием. Также у растений салата, помещенных перед сбором урожая на 2 сут в условия КО, отмечено увеличение активности СОД, антирадикальной активности (по методу DPPH) и суммарного содержания фенольных соединений [28].

Известно, что антоцианы играют фотопротекторную роль и помогают восстанавливать баланс между поглощением света и фиксацией CO<sub>2</sub>, снижая таким образом возможность фотоокислительного повреждения [29]. В данной работе количественно содержание антоцианов мы не определяли, но отмечали фиолетовую окраску нижней стороны листьев, которые подвергались КО и не имели признаков фотоповреждений. Можно предположить, что содержание антоцианов в этих листьях было повышенным, что также способствовало усилению антиоксидантной активности в них.

Небольшое снижение значений  $F_v/F_m$  и  $\Phi_{II}$  у листьев, подвергшихся действию КО в период лог-фазы, которое наблюдалось в наших опытах и в других работах на других объектах [28], также свидетельствует о том, что растения “чувствуют” избыточное освещение и защищаются от его негативного влияния. При этом снижение значений  $F_v/F_m$  и  $\Phi_{II}$  в таких случаях не сказывается на фотосинтетической способности листьев, но свидетельствует о динамическом фотоингибировании, которое защищает фотосинтетический аппарат от повреждения [30]. Вопрос о том, является ли фотоингибирование стресс-реакцией или это защитно-приспособительная реакция, направленная на согласование световых реакций фотосинтеза со сложной и разветвленной последовательностью биохимических реакций, происходящих в темновой фазе фотосинтеза, остается пока дискуссионным.

Следует сказать, что влияние положения листа на растении трудно разграничить с влиянием фазы роста листа. Понятно, что в момент переключения светового режима на КО листья с большим порядковым номером будут находиться на более ранних стадиях развития. Все же сравнив листья с разным порядковым номером, находящихся в одинаковых фазах роста (хотя и различавшихся как находящиеся в начале фазы или в ее середине) на растениях одного возраста, мы пришли к выводу, что порядковый номер листа не несет принципиального значения. Листья с разным порядковым номером, испытавшие действие КО, начиная с лаг-фазы, имели признаки светового повреждения, в то время как листья с разными

порядковыми номерами, находившиеся в лог-фазе в момент начала действия КО, имели сходные характеристики, проявляя намного меньшую чувствительность к КО. Что касается листьев с признаками световых повреждений (хлороз), то установлено, что степень хлороза усиливалась с увеличением порядкового номера листа, т.е. у последующих листьев. Очевидно, это связано с тем, что листья с большим порядковым номером находились на более ранних стадиях развития в момент начала действия КО.

Таким образом, результаты проведенных опытов показали, что в чувствительности листьев к КО главную роль играет фаза роста листа, на которой он подвергается действию КО. Возрастная изменчивость в чувствительности и/или устойчивости листьев к КО предположительно связана с разной степенью активности компонентов АОС, в частности антиоксидантных ферментов. Листья, подвергающиеся КО в лаг-фазе, неспособны в дальнейшем противостоять окислительному стрессу, вызванному КО (из-за низкой активности ферментов АОС), и у них развиваются фотоповреждения в виде межжилкового хлороза. Листья же, которые прошли лаг-фазу роста в нормальных световых условиях и подвергались действию КО уже в лог-фазе, оказываются более устойчивыми к действию КО. Для них характерна более высокая активность ферментов АОС (КАТ, АПО, ПО) и как следствие у них не развивается окислительный стресс, вызванный чрезмерным освещением. Порядковый же номер листа не влияет значимо на устойчивость к КО, а с увеличением возраста растений их устойчивость к КО повышается.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-016-00033а. Работа выполнена с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук” в рамках государственного задания КарНЦ РАН (0218-2019-0074).

#### FUNDING

The reported study was funded by RFBR, project number 20-016-00033а.

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

#### СПИСОК ЛИТЕАТУРЫ

1. *Zha L., Zhang Y., Liu W.* Dynamic responses of ascorbate pool and metabolism in lettuce to long-term continuous light provided by red and blue LEDs // *Envi-*

*ron. Exp. Bot.* 2019. V. 163. P. 15.  
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.04.003>

2. *Sysoeva M.I., Markovskaya E.F., Shibaeva T.G.* Plant under continuous light: a review // *Plant Stress.* 2010. V. 4. P. 5.
3. *Velez-Ramirez A.I., van Ieperen W., Vreugdenhil D., Millenaar F.F.* Plants under continuous light // *Trends Plant Sci.* 2011. V. 16. P. 310.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.02.003>
4. *Шубаева Т.Г., Тумов А.Ф.* Влияние круглосуточного освещения на пигментный комплекс растений сем. *Solanacea* // Труды Карельского научного центра РАН. Серия Экспериментальная биология. 2017. № 5. С. 111.  
<https://doi.org/10.17076/eb498>
5. *Kitaya Y., Niu G., Kozai T., Ohashi M.* Photosynthetic photon flux, photoperiod, and CO<sub>2</sub> concentration affect growth and morphology of lettuce plug transplants // *Hort. Sci.* 1998. V. 33. P. 988.  
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.33.6.988>
6. *Ohyama K., Manabe K., Omura Y., Kubota C., Kozai T.* A comparison between closed-type and open-type transplant production systems with respect to quality of tomato plug transplants and resource consumption during summer // *Environ. Control Biol.* 2003. V. 41. P. 57.  
<https://doi.org/10.2525/ecb1963.41.57>
7. *Hao X., Zhang Y., Guo X., Little C., Zheng J., Khosla S.* Temperature drop improved responses of greenhouse fruit vegetables to long photoperiod of supplemental lighting // *Acta Hort.* 2017. V. 1182. P. 185.  
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1182.22>
8. *Lanoue J., Zheng J., Little C., Thibodeau A., Grodzinski B., Hao X.* Alternating red and blue light-emitting diodes allows for injury-free tomato production with continuous lighting // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. P. 1114.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01114>
9. *Guo X., Hao X., Zheng J.M., Little C., Khosla S.* Response of greenhouse mini-cucumber to different vertical spectra of LED lighting under overhead high pressure sodium and plasma lighting // *Acta Hort.* 2016. V. 1134. P. 87.  
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1134.12>
10. *Hao X., Zhang Y., Guo X., Little C., Zheng J.* Dynamic temperature control strategy with a temperature drop improves responses of greenhouse tomatoes and sweet peppers to long photoperiods of supplemental lighting and saves energy // *Acta Hort.* 2018. V. 1227. P. 291.  
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1227.35>
11. *Hao X., Guo X., Lanoue J., Zhang Y., Cao R., Zheng J., Little C., Leonardos D., Khosla S., Grodzinski B., Yelton M.* A review on smart application of supplemental lighting in greenhouse fruiting vegetable production // *Acta Hort.* 2018. V. 1227. P. 499.  
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1227.63>
12. *Nelson J.A., Bugbee B.* Economic analysis of greenhouse lighting: light emitting diodes vs. high intensity discharge fixtures // *PLoS ONE.* 2014. V. 9: e99010.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099010>
13. *Velez-Ramirez A., Carreno-Quintero N., Vreugdenhil D., Millenaar F.F., van Ieperen W.* Sucrose and starch content negatively correlates with PSII maximum quantum

- efficiency in tomato (*Solanum lycopersicum*) exposed to abnormal light/dark cycles and continuous light // *Plant Cell Physiol.* 2017. V. 58. P. 1339.  
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcx068>
14. *Velez-Ramirez A.I., Dünner-Planella G., Vreugdenhil D., Millenaar F.F., van Ieperen W.* On the induction of injury in tomato under continuous light: circadian asynchrony as the main triggering factor // *Funct. Plant Biol.* 2017. V. 6. P. 597.  
<https://doi.org/10.1071/FP16285>
  15. *Velez-Ramirez A., Vreugdenhil D., Millenaar F.F., van Ieperen W.* Phytochrome A protects tomato plants from injuries induced by continuous light // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. P. 19.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00019>
  16. *Velez-Ramirez A.I., van Ieperen W., Vreugdenhil D., van Poppel P.M.J.A., Heuvelink E., Millenaar F.F.* A single locus confers tolerance to continuous light and allows substantial yield increase in tomato // *Nature Commun.* 2014. V. 5. P. 4549.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms5549>
  17. *Лисовский Г.М., Долгушев В.А.* Очерки частной светокультуры растений. Новосибирск: Наука, 1986. 127 с.
  18. *Hillman W.S.* Injury of tomato plants by continuous light and unfavorable photoperiodic cycles // *Amer. J. Bot.* 1956. V. 43. P. 89.  
<https://doi.org/10.2307/2438816>
  19. *Lichtenthaler H.K., Wellburn A.R.* Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents // *Biochem. Soc. Trans.* 1983. V. 603. P. 591.  
<https://doi.org/10.1042/bst0110591>
  20. *Shibaeva T.G., Mamaev A.V., Sherudilo E.G.* Evaluation of a SPAD-502 Plus Chlorophyll Meter to estimate chlorophyll content in leaves with interveinal chlorosis // *Russ. J. Plant Physiol.* 2020. V. 67. P. 690.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443720040160>
  21. *Maxwell K., Johnson G.N.* Chlorophyll fluorescence – a practical guide // *J. Exp. Bot.* 2000. V. 51. P. 659.  
<https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>
  22. *Burritt D.J., Mackenzie S.* Antioxidant metabolism during acclimation of *Begonia* × *erythrophylla* to high light levels // *Ann. Bot.* 2003. V. 91. P. 783.  
<https://doi.org/10.1093/aob/mcg076>
  23. *Tarakanov I.G.* Photoperiodism in crops // *Izvestiya TAA.* 2014. V. 6. P. 38.
  24. *Khudairi A.-K., Hammer K.C.* The relative sensitivity of *Xanthium* leaves of different ages to photoperiodic induction // *Plant Physiol.* 1954. V. 29. P. 251.  
<https://doi.org/10.1104/pp.29.3.251>
  25. *Hague M.S., Kjaer K.H., Roserqvist E., Ottosen C.O.* Continuous light increases growth, daily carbon gain, antioxidants, and alters carbohydrate metabolism in a cultivated and a wild tomato species // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. P. 522.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00522>
  26. *Murage E.N., Masuda M.* Response of pepper and eggplant to continuous light in relation to leaf chlorosis and activities of antioxidative enzymes // *Sci. Hortic.* 1997. V. 70. P. 269.  
[https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(97\)00078-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(97)00078-2)
  27. *Zhou W.L., Liu W.K., Yang Q.C.* Quality changes in hydroponic lettuce grown under pre-harvest short-duration continuous light of different intensities // *J. Hort. Sci. Biotech.* 2012. V. 87. P. 429.  
<https://doi.org/10.1080/14620316.2012.11512890>
  28. *Bian Z.-H., Cheng R.-F., Yang Q.-C., Wang J.* Continuous light from red, blue, and green light-emitting diodes reduces nitrate content and enhances phytochemical concentrations and antioxidant capacity in lettuce // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 2016. V. 141. P. 186.  
<https://doi.org/10.21273/JASHS.141.2.186>
  29. *Steyn W.J., Wand S.J.E., Holcroft D.M., Jacobs G.* Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection // *New Phytol.* 2002. V. 155. P. 349.  
<https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00482.x>
  30. *Osmond B., Förster B.* Photoinhibition: Then and Now // *Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment. Advances in Photosynthesis and Respiration.* V. 21 / Eds. Demmig-Adams B., Adams W.W., Mattoo A.K. Springer, Dordrecht, 2008.  
[https://doi.org/10.1007/1-4020-3579-9\\_2](https://doi.org/10.1007/1-4020-3579-9_2)

## ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЛИКОЗИДОВ ФЕНИЛЭТИЛАМИДОВ ГИДРОКСИКОРИЧНЫХ КИСЛОТ В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК *Mandragora turcomanica*

© 2021 г. Д. В. Кочкин<sup>а, с, \*</sup>, Б. А. Галишев<sup>б</sup>, М. В. Титова<sup>с</sup>, Е. В. Попова<sup>с</sup>, А. М. Носов<sup>а, с</sup>

<sup>а</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

<sup>б</sup>Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

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

\*e-mail: dmitry-kochkin@mail.ru

Поступила в редакцию 30.07.2020 г.

После доработки 25.12.2020 г.

Принята к публикации 25.12.2020 г.

Проведено подробное хромато-масс-спектрометрическое изучение вторичных метаболитов в биомассе суспензионной культуры клеток мандрагоры туркменской (*Mandragora turcomanica* Mizgir.), которая поддерживается в активно растущем состоянии более 30 лет. Идентифицированы как широко распространенные у растений соединения (амиды гидроксикоричных кислот с путресцином и ферулоилтирамин), так и весьма редкие метаболиты (гликозиды фенилэтиламидов гидроксикоричных кислот). Идентификацию соединений проводили с помощью ультраэффективной жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией высокого разрешения при ионизации электрораспылением (УЭЖХ-ИЭР-МС) и детектировании положительно и отрицательно заряженных ионов. Структурный анализ гликозидов фенилэтиламидов феруловой кислоты осуществлен на основании расшифровки МС-спектров, полученных при фрагментации протонированных молекулярных ионов  $[M + H]^+$  этих соединений в источнике ионизации. На основании полученных результатов показано наличие в клетках *M. turcomanica*, культивируемых *in vitro*, пяти гексозидов феруловой кислоты, три из которых с остатками тирамина, и по одному с остатками метокситирамина и октопамина соответственно. Один из обнаруженных гликозидов относится к очень редкой группе метаболитов растений – дигексозиды ферулоилтирамина. Полученные результаты подтверждают разрабатываемую в наших работах концепцию об изменении специализированного обмена в культивируемых *in vitro* клетках высших растений, свидетельствуют о сохранении в дедифференцированных пролиферирующих клетках способности к образованию сложного набора вторичных метаболитов, что противоречит сложившимся представлениям об утрате или снижении интенсивности специализированного метаболизма в культурах клеток высших растений.

**Ключевые слова:** *Mandragora turcomanica*, суспензионная культура клеток, тирамин, гликозиды фенилэтиламидов феруловой кислоты, вторичный метаболизм

DOI: 10.31857/S0015330321050080

### ВВЕДЕНИЕ

Растения являются одними из самых сложных по своему химическому составу организмов. Вариабельная часть этого состава определяется, прежде всего, образованием и накоплением веществ “специализированного” обмена (вторичных метаболитов), роль которых в жизнедеятельности растения является предметом многочисленных дискуссий. В настоящее время преобладающей точкой зрения — участие вторичных метаболитов во взаимодействии растения с окружающей средой: формирование и регуляция связей в различных типах сосуществования растений с другими организмами (симбиотические, антагонистические и другие варианты

отношений организмов), реакция растительного организма на изменения абиотических факторов среды и т.д. [1]. Одним из перспективных подходов к выяснению функциональной значимости вторичного метаболизма является его изучение в культуре клеток высших растений — уникальной биологической системе, в которой многие биохимические процессы (включая и вторичный метаболизм) реализуются отличным от интактных растений образом [1, 2]. Сопоставление закономерностей специализированного обмена в растительных клетках *in vivo* и *in vitro* при знании специфики и условий их жизнедеятельности позволяет делать обоснованные выводы о функциональной роли этого процесса [1].

В настоящее время фитохимическое изучение клеток растений *in vitro* в большинстве случаев осуществляется путем сопоставления хроматографических профилей экстрактов из биомассы культур клеток с хроматограммами стандартных образцов характерных для конкретного растения вторичных метаболитов (эту стратегию фитохимического изучения культур клеток растений условно можно обозначить как “классическую”) [2]. Такой подход не позволяет обнаружить весь спектр образуемых в культурах клеток соединений, что, по-видимому, лежит в основе широко распространенного мнения об ограниченности специализированного метаболизма в клетках растений *in vitro* [1–3]. В то же время, тщательное химическое изучение культур клеток растений с применением всего арсенала фитохимических методов (различные варианты тонкослойной хроматографии, препаративное выделение индивидуальных соединений и описание их структуры с помощью спектроскопии ЯМР и т.д.) свидетельствует о возможности образования в культивируемых клетках растений нехарактерных и/или “минорных” (встречающиеся редко и в исчезающе малых количествах) для интактных растений метаболитов, коммерческие стандартные образцы которых в подавляющем большинстве случаев отсутствуют [2, 4]. Таким образом, “классическая” стратегия фитохимического анализа не всегда предоставляет корректные сведения о разнообразии вторичных метаболитов в клетках растений *in vitro*.

Современный этап развития фитохимии характеризуется активным использованием при описании структурного разнообразия вторичных метаболитов в интактных растениях различных видов хромато-масс-спектрометрии [5]. В наиболее универсальном варианте этот экспериментальный подход основан на совместном применении жидкостной хроматографии (высоко- или ультраэффективной – ВЭЖХ или УЭЖХ соответственно) с квадрупольной-времяпролетной масс-спектрометрией при электрораспылительной ионизации. В англоязычной литературе этот экспериментальный подход именуется как LC-ESI-Q-TOF-MS (liquid chromatography electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry) [5]. Применение LC-ESI-Q-TOF-MS при фитохимическом анализе позволило существенно расширить представления о сложности химического состава растений. В одной из пионерских работ этого направления было показано, что LC-ESI-Q-TOF-MS позволяет обнаружить и структурно описать в различных образцах видов женьшеня (*Panax spp.*) более 600 тритерпеновых гликозидов (гинзенозидов) разной структуры [6]. При этом возможна надежная структурная идентификация метаболитов, содержание которых исчезающе мало – до  $10^{-4}\%$  от сухой массы растительных образцов, что было

подтверждено с помощью “классических” методов фитохимии: препаративного выделения индивидуальных соединений и изучения их структуры с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) [6].

Однако если при исследовании интактных растений хромато-масс-спектрометрия (в том числе и LC-ESI-Q-TOF-MS) в настоящее время является уже рутинным методом, то для фитохимического анализа культивируемых *in vitro* клеток растений этот экспериментальный подход используется достаточно редко [7]. На основании изложенного можно предположить, что использование хромато-масс-спектрометрии, прежде всего LC-ESI-Q-TOF-MS, при изучении культур клеток растений позволит получить более объективную информацию о биохимических особенностях этой уникальной биологической системы, и поэтому подобные работы имеют несомненное фундаментальное и прикладное значение.

Мандрагора (*Mandragora spp.*) – род травянистых многолетних растений семейства Solanaceae. Является легендарным растением средневековой Европы, упоминается в Библии. В настоящее время установлено, что многие свойства мандрагоры обусловлены наличием тропановых алкалоидов – гиосциамина, атропина, скополамина и ряда других [8–10].

Эндемичный вид горных районов юго-запада Туркмении *Mandragora turcomanica* Mizgir. был описан в 1942 году и является, пожалуй, одним из наиболее редких лекарственных растений [8]. Природная популяция *M. turcomanica* насчитывает всего несколько сотен экземпляров растений. При этом особенности биологии этого растения затрудняют интродукцию вида (например, в условиях ботанических садов) и/или плантационное выращивание [8–10]. Эти обстоятельства предопределяют актуальность работ по получению и подробному изучению культур клеток *M. turcomanica in vitro*.

В 1981 году в ИФР РАН Р.Г. Бутенко и Н.А. Мясовым из листа интактного растения *M. turcomanica* была получена культура клеток, которая поддерживается в растущем состоянии методом пересева по настоящее время.

Целью настоящей работы было фитохимическое изучение с помощью ультраэффективной жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией высокого разрешения при ионизации электрораспылением (УЭЖХ-ИЭР-МС, один из вариантов LC-ESI-Q-TOF-MS), биомассы суспензионной культуры клеток *M. turcomanica*, поддерживаемой в культуре *in vitro* более 30 лет.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объект исследования.** В качестве объекта исследования использовали гетеротрофную суспензионную культуру клеток мандрагоры туркменской (*Mandragora turcomanica* Mizgir.), которая поддерживается в активно растущем состоянии с 1981 г. во Всероссийской коллекции культур клеток высших растений ИФР РАН под № 31 [11].

**Условия выращивания культуры клеток.** Культуру клеток *M. turcomanica* выращивали (в соответствии с коллекционным паспортом) на модифицированной питательной среде с минеральной основой по Мурасиге-Скугу [12] с добавлением глюкозы (4%), тиамин (1 мг/л),  $\alpha$ -НУК (3 мг/л) и БАП (0.5 мг/л) [13]. Культивирование проводили в темноте, при 26°C, на качалке (90 об./мин), в колбах объемом 250 мл с укупоркой двойным слоем алюминиевой фольги и слоем офсетной бумаги (30–40 мл суспензии в колбе). Цикл субкультивирования составлял две недели. Для химического анализа использовали биомассу на 10 сут после пересева (экспоненциальная фаза роста культуры).

**Подготовка проб для УЭЖХ-ИЭР-МС анализа.** Навеску воздушно-сухого растительного материала (31 мг) экстрагировали 3 раза по 1 мл 70% (по объему) водного этилового спирта в течение 30 минут под действием ультразвука (УЗВ-12, Сапфир, Россия), после чего центрифугировали при 10000 об./мин в течение 10 минут (Микроцентрифуга МЦФ, Россия) и отбирали супернатант в грушевидную колбу. Объединенные спиртовые экстракты упаривали под вакуумом (при температуре 55°C). Полученный экстракт суспендировали в 1 мл дистиллированной воды и наносили на патрон для твердофазной экстракции Supelclean ENVI-18 (Supelco, США). Патрон промывали 3 мл дистиллированной воды, анализы смывали 3 мл этанола. Полученный раствор упаривали под вакуумом при 55°C. Перед анализом экстракты растворяли в 1 мл смеси ацетонитрил-вода (1 : 1, по объему).

**УЭЖХ-ИЭР-МС.** Анализ проводили на хроматографе Waters Acquity UPLC (Waters, США), оснащенный гибридным квадрупольным время-пролетным масс-спектрометром XEVO QTOF (Waters, США). Пробу в объеме 1 мкл наносили на колонку ACQUITY UPLC BEH Phenyl (50 × 2.1 мм, 1.7 мкм; Waters, Ирландия). Температура колонки составляла 40°C, объемная скорость потока подвижной фазы – 0.4 мл/мин. В качестве подвижной фазы использовали 0.1% (по объему) раствор муравьиной кислоты в воде (растворитель А) и 0.1% (по объему) раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (растворитель Б). Хроматографическое разделение проводили в режиме градиентного элюирования. В процессе анализа состав подвижной фазы менялся следующим образом (Б, % по объему): 0–1 мин – 15%, 1–5 мин –

от 15 до 30%, 5 – 15 мин – от 30 до 38%, 15 – 15.5 мин – от 38 до 45%, 15.5 – 23 мин – 45%, 23 – 23.5 мин – от 45 до 95%. Анализ осуществляли в режиме детектирования положительных и отрицательных ионов (диапазон  $m/z$  100–2000). Параметры источника ионизации: температура источника ионизации 120°C, температура десольвации 250°C, напряжение на капилляре 3.0 кВ, напряжение на конусе ввода пробы 30 В, скорость подачи азота (десольвационный газ) 600 л/час. Обработку полученных результатов производили с помощью программы MassLynx (Waters, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе работы был проведен УЭЖХ-ЭР-МС анализ спиртового экстракта из биомассы суспензионной культуры клеток *M. turcomanica* в режиме детектирования положительно-заряженных ионов. Выбор этого режима обусловлен тем фактом, что при ионизации электрораспылением для положительно-заряженных ионов (прежде всего, протонированных молекул ( $[M + H]^+$ ) многих природных соединений наблюдается фрагментация (с образованием характеристических осколочных ионов) уже в источнике ионизации [14, 15]. Анализ полученных таким образом масс-спектров позволяет провести достаточно быструю первичную структурную идентификацию соединений без осуществления дополнительных тандемных масс-спектрометрических экспериментов [15]. Для хроматографического разделения использовали градиентную программу элюирования, разработанную ранее для анализа природных соединений широкого диапазона полярности на хроматографических колонках с обращенной фазой [15].

Полученная УЭЖХ-ЭР-МС хроматограмма (полный ионный ток) представлена на рисунке 1. В общей сложности в экстракте из биомассы суспензионной культуры клеток *M. turcomanica* было обнаружено 9 хроматографических пиков соединений (элюируются с хроматографической колонки в пределах 0.5–4.0 мин), которые в порядке увеличения времени удерживания на хроматографической колонке были обозначены номерами от 1 до 9.

Для структурной идентификации обнаруженных соединений использовали следующую информацию: расшифровка результатов масс-спектрометрии (фрагментации протонированных молекул соединений в источнике ионизации), определение (на основании сравнения расчетного и экспериментально-измеренного значений точной мономерной массы) элементного состава соединений [16] и сравнение масс-спектрометрического и относительного хроматографического поведения соединений с данными литературы [17–22]. Данные масс-спектров и результаты иден-

тификации обнаруженных соединений представлены в табл. 1.

Общий анализ масс-спектров положительных ионов обнаруженных соединений (табл. 1) позволяет предположить, что все они относятся к группе амидов гидроксикоричных кислот [17]. На основании структурных особенностей эти метаболиты можно разделить на четыре группы: метаболиты 1–3 – производные алифатического диамина путресцина, ацилированные остатками гидроксикоричных кислот; метаболит 9 – амид феруловой кислоты с ароматическим моноамином тирамином; метаболиты 5–8 – гексозиды амидов феруловой кислоты с тирамином (метаболиты 5–7) и метокситирамином (метаболит 8); метаболит 4 – гексозид амида феруловой кислоты с ароматическим моноамином октопамином (содержит гидроксильную группу в алифатической части моноамина). Для масс-спектров положительных ионов каждой из этих групп соединений отмечаются определенные особенности.

В масс-спектрах положительных ионов метаболитов 1–3 присутствуют три интенсивных сигнала: ион протонированной молекулы  $[M + H]^+$  (справедливость идентификации этого иона подтверждается наличием иона аддукта  $[M + Na]^+$ ) и два осколочных иона, образующихся в результате нейтральной потери 17 Да (отщепление концевой аминогруппы (в виде  $NH_3$ , ион  $[M + H - 17]^+$ ) остатка путресцина) и 88 Да (отщепление целого остатка путресцина,  $C_4H_{12}N_2$ , ион  $[M + H - 88]^+$ ). Характеристический ион  $[M + H - 88]^+$  соответствует остатку гидроксикоричной кислоты, ацилирующей одну из аминогрупп путресцина: для соединений 1 и 2 этот ион имеет значение  $m/z$  163 (характеристический ион остатка кофейной кислоты,  $C_9H_7O_3^+$ ); для соединения 3 –  $m/z$  177 (характеристический ион остатка феруловой кислоты,  $C_{10}H_9O_3^+$ ). Таким образом, метаболиты 1, 2 и 3, по всей видимости, имеют структуру путресцина, ацилированного остатками кофейной (метаболиты 1 и 2) и феруловой (метаболит 3) кислот. Описанные закономерности фрагментации в источнике ионизации  $[M + H]^+$  данных соединений вполне согласуются с данными литературы [17, 21].

В масс-спектре соединения 9 присутствуют два интенсивных сигнала:  $[M + H]^+$  и осколочный характеристический ион ( $m/z$  177), соответствующий остатку феруловой кислоты. Разница между значениями  $m/z$  этих ионов соответствует нейтральной потере остатка тирамина (нейтральная потеря 137 Да,  $C_8H_{11}NO$ ) [17, 18, 22]. На основании этих результатов соединение 9 идентифицировано как амид феруловой кислоты и тирамина.

Фрагментация в источнике ионизации протонированных молекул  $[M + H]^+$  соединений 5–8

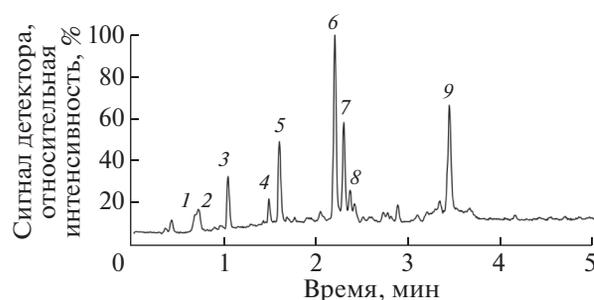


Рис. 1. УЭЖХ ЭР МС хроматограмма (записана в режиме полного ионного тока при регистрации положительных ионов) экстракта из биомассы суспензионной культуры клеток *M. turcomanica* (линия 31, 10 сут выращивания). Номера 1–9 – пики идентифицированных соединений (табл. 1 и 2).

сопровождается образованием серии осколочных ионов, соответствующих последовательному отщеплению одного или двух остатков дегидрированной гексозы (нейтральная потеря 162 Да,  $C_6H_{10}O_5$ ). В масс-спектрах положительных ионов соединений 5–8 присутствует характеристический ион с  $m/z$  177. Анализ закономерностей фрагментации этих метаболитов также позволяет заключить, что в качестве “амино-компоненты” у соединений 5–7 выступает тирамин (нейтральная потеря 137 Да), а у соединения 8 – метокситирамин (нейтральная потеря 167 Да,  $C_9H_{13}NO_2$ ). Таким образом, на основании изложенных результатов можно предположить, что соединения 5–8 соответствуют гликозидам (точнее – гексозидам) амидов феруловой кислоты с тирамином/метокситирамином. На основании данных только масс-спектрометрии невозможно установить, каким в точности моносахаридам соответствуют остатки гексоз, обнаруженных в составе соединений 5–8 [17, 22]. У растений встречаются гексозиды ферулоилтирамина с глюкопиранозой, галактопиранозой или аллопиранозой [17, 20, 22, 23]. Кроме того, на основании полученных масс-спектров нельзя делать выводы о позиции гликозилирования – гидроксильная группа гидроксикоричной кислоты или моноамина (у растений встречаются оба варианта присоединения углеводных цепочек к молекулам фенилэтил-амидов феруловой кислоты) [17, 24, 25]. Остается также нерешенным вопрос о конфигурации двойной связи (в природе встречаются как цис-, так и транс-изомеры) остатка феруловой кислоты [17, 24]. Для уточнения этих элементов структуры соединений 5–8 требуются дополнительные исследования.

Особенностью масс-спектра положительных ионов соединения 4 (по сравнению с масс-спектрами соединений 5–8) является наличие интенсивного иона – продукта отщепления остатка воды (нейтральная потеря 18 Да) непосредственно

**Таблица 1.** Результаты УЭЖХ-ЭР-МС анализа (регистрация положительных ионов) экстракта из биомассы суспензионной культуры клеток *M. tirsoanica* (линия 31, 10 сут выращивания в колбах)

Номер пика*	$t_R$ , мин**	Масс-спектры, $m/z$ ***			Результаты идентификации****
		[M + H] <sup>+</sup>	[M + Na] <sup>+</sup>	Другие ионы	
1	0.68	251.1381 C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (-6.0 ppm)	273.1264 C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Na (более 10 ppm)	234.11 [M + H - 17] <sup>+</sup> 163.03 [M + H - 88] <sup>+</sup>	N-кофеоил-путресцин
2	0.72	251.1374 C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (-8.8 ppm)	273.1220 C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Na (1.8 ppm)	234.11 [M + H - 17] <sup>+</sup> 163.03 [M + H - 88] <sup>+</sup>	Изо-N-кофеоил-путресцин
3	1.04	265.1542 C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (-3.8 ppm)	287.1386 C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Na (4.9 ppm)	248.13 [M + H - 17] <sup>+</sup> 177.03 [M + H - 88] <sup>+</sup>	N-ферулоил-путресцин
4	1.48	492.1873 C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> NO <sub>10</sub> (-0.6 ppm)	514.1654 C <sub>24</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>10</sub> Na (-1.6 ppm)	474.18 [M + H - 18] <sup>+</sup> 312.12 [M + H - 18 - 162] <sup>+</sup> 177.05 [M + H - 162 - 18 - 135] <sup>+</sup>	N-ферулоил-октопамин-Нex
5	1.60	638.2429 C <sub>30</sub> H <sub>40</sub> NO <sub>14</sub> (-3.1 ppm)	660.2264 C <sub>30</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>14</sub> Na (-0.6 ppm)	476.19 [M + H - 162] <sup>+</sup> 314.13 [M + H - 162 - 162] <sup>+</sup> 177.05 [M + H - 162 - 162 - 137] <sup>+</sup>	N-ферулоил-тирамин-Нex-Нex
6	2.20	476.1908 C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> NO <sub>9</sub> (-2.7 ppm)	498.1713 C <sub>24</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>9</sub> Na (-5.4 ppm)	314.14 [M + H - 162] <sup>+</sup> 177.05 [M + H - 162 - 137] <sup>+</sup>	N-ферулоил-тирамин-Нex
7	2.29	476.1887 C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> NO <sub>9</sub> (-7.1 ppm)	498.1696 C <sub>24</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>9</sub> Na (-8.8 ppm)	314.13 [M + H - 162] <sup>+</sup> 177.06 [M + H - 162 - 137] <sup>+</sup>	Изо-N-ферулоил-тирамин-Нex
8	2.36	506.1852 C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> NO <sub>10</sub> (более 10 ppm)	528.1866 C <sub>25</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>10</sub> Na (3.8 ppm)	344.15 [M + H - 162] <sup>+</sup> 177.05 [M + H - 162 - 167] <sup>+</sup>	N-ферулоил-метокситирамин-Нex
9	3.43	314.1385 C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>4</sub> (-2.2 ppm)	336.1226 C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub> Na (4.2 ppm)	177.03 [M + H - 137] <sup>+</sup>	N-ферулоил-тирамин

Примечание: \* нумерация пиков соответствует таковой на рис. 1; \*\* время удерживания на хроматографической колонке, мин; \*\*\* данные масс-спектров (указаны: значения  $m/z$  для обнаруженных ионов, элементарный состав и ошибка определения массы (указана в скобках в единицах миллионная доля (ppm)) ионов [M + H]<sup>+</sup> и [M + Na]<sup>+</sup>); \*\*\*\*\* остатки гидроксикоричных кислот, входящие в состав обнаруженных соединений, могут иметь как цис-, так и транс-конфигурацию двойной связи в боковой цепи. Обозначения: Нex — остаток гексозы.

**Таблица 2.** Результаты УЭЖХ ЭР МС анализа (регистрация отрицательных ионов) экстракта из биомассы суспензионной культуры клеток *M. turcomanica* (линия 31, 10 сут выращивания в колбах)

Номер пика*	$t_R$ , мин**	Масс-спектры, $m/z$ ***		Результаты идентификации****
		$[M - H]^-$	Другие ионы	
1	0.68	249.12	499.25 $[2M - H]^-$	N-кофеоил-путресцин
2	0.72	249.12	499.26 $[2M - H]^-$	Изо-N-кофеоил-путресцин
3	1.04	263.16	–	N-ферулоил-путресцин
4	1.48	490.16	981.34 $[2M - H]^-$ 328.12 $[M - H - 162]^-$	N-ферулоил-октопамин-Нех
5	1.60	636.21	1273.46 $[2M - H]^-$ 1319.47 $[2M - H + HCOOH]^-$ 474.16 $[M - H - 162]^-$	N-ферулоил-тирамин-Нех-Нех
6	2.20	474.17	1424.53 $[3M - H]^-$ 949.34 $[2M - H]^-$ 995.37 $[2M - H + HCOOH]^-$ 312.12 $[M - H - 162]^-$ 520.18 $[M - H + HCOOH]^-$ 542.16 $[M - H + HCOONa]^-$ 537.16 $[M - H + HCOONH_4]^-$	N-ферулоил-тирамин-Нех
7	2.29	474.17	949.34 $[2M - H]^-$ 312.12 $[M - H - 162]^-$ 542.16 $[M - H + HCOONa]^-$ 537.17 $[M - H + HCOONH_4]^-$	Изо-N-ферулоил-тирамин-Нех
8	2.36	504.18	1009.38 $[2M - H]^-$ 342.13 $[M - H - 162]^-$ 572.17 $[M - H + HCOONa]^-$ 567.19 $[M - H + HCOONH_4]^-$	N-ферулоил-метокситирамин-Нех
9	3.43	312.12	625.25 $[2M - H]^-$ 380.11 $[M - H + HCOONa]^-$	N-ферулоил-тирамин

Примечание: \* нумерация пиков соответствует таковой в табл. 1; \*\* время удерживания на хроматографической колонке, мин; \*\*\* данные масс-спектров (указаны значения  $m/z$  для обнаруженных ионов); \*\*\*\* остатки гидроксикоричных кислот, входящие в состав обнаруженных соединений, могут иметь как цис-, так и транс-конфигурацию двойной связи в боковой цепи. Обозначения: Нех – остаток гексозы.

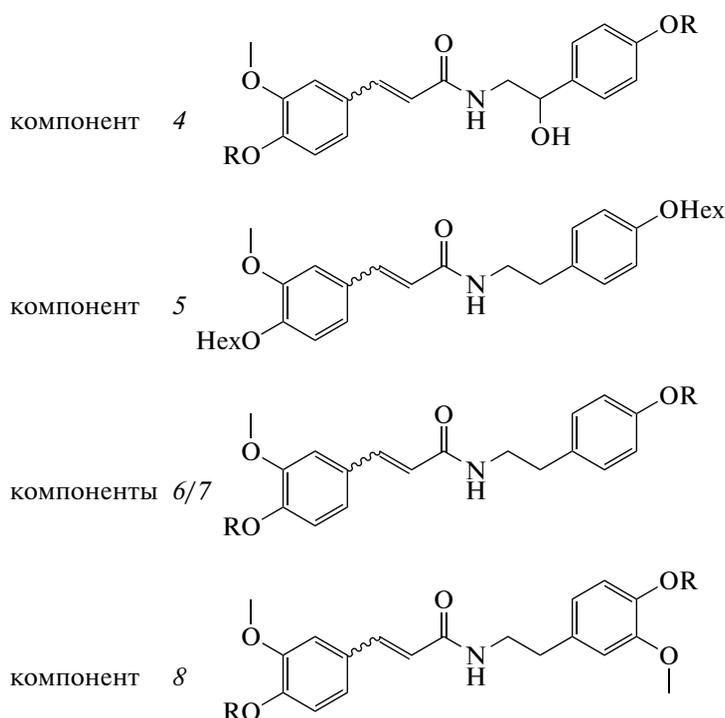
от протонированной молекулы  $[M + H]^+$ . В масс-спектре также присутствуют осколочные ионы, образующиеся в результате нейтральной потери остатка гексозы и характеристический ион с  $m/z$  177. В совокупности изложенные результаты позволяют предположить, что соединение 4 соответствует гексозиду амида феруловой кислоты с моноамином октопамином (содержит гидроксильную группу в алифатической части молекулы моноамина; наличие двух нейтральных потерь 18 Да и 135 Да ( $H_2O$  и  $C_3H_9NO$  соответственно)) [18].

Справедливость проведенной интерпретации масс-спектров положительных ионов соединений 1–9 подтверждается результатами УЭЖХ-

ЭР-МС анализа спиртового экстракта из биомассы суспензионной культуры клеток *M. turcomanica* в режиме детектирования отрицательно-заряженных ионов (табл. 2).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Идентифицированные в биомассе суспензионной культуры клеток *M. turcomanica* амиды гидроксикоричных кислот с путресцином (компоненты 1–3) довольно широко распространены у растений и в настоящее время рассматриваются как запасные формы, участвующие в регуляции гомеостаза этого диамина в растительных клетках



**Рис. 2.** Структурные формулы идентифицированных (на основании результатов УЭЖХ ЭР МС) в биомассе суспензионной культуры клеток *M. turcomanica* гликозидов фенилэтиламидов феруловой кислоты. Обозначения: R – H или Hex. Hex – остаток гексозы.

[26, 27]. Ферулоилтирамин (компонент 9) относится к небольшой группе широко распространенных у растений фенилэтиламидов гидроксикоричных кислот – индуцибельных метаболитов, участвующих в биохимических реакциях растений на воздействие стресс-факторов различной природы, а также предшественников обширного класса лигнанаминов [26]. В то же время, обнаруженные в культивируемых *in vitro* клетках *M. turcomanica* гликозиды фенилэтиламидов феруловой кислоты (компоненты 4 – 8; рис. 2) относятся к одной из самых редких групп вторичных метаболитов растений. Действительно, если закономерности распространения и биосинтеза фенилэтиламидов гидроксикоричных кислот изучены достаточно подробно и с завидной частотой обобщаются в обзорных статьях [26, 27], то структурное разнообразие их конъюгатов с остатками сахаров изучено значительно хуже. В настоящее время из растений выделено около 10 моногексозидов (глюкозидов, галактозидов и аллозидов) фенилэтиламидов гидроксикоричных кислот, а для дигексозидов этих соединений (подобный метаболит идентифицирован в настоящей работе (соединение 5)) описана лишь единственная структура [20, 23–25, 28]. Гликозиды фенилэтиламидов гидроксикоричных кислот распространены в растительном мире спорадически (зафиксировано их присутствие в представителях семейств *Amaranthaceae*/

*Chenopodiaceae*, *Aristolochiaceae*, *Menispermaceae*, *Papaveraceae*, *Ranunculaceae* и *Solanaceae*) и накапливаются в растительных тканях в следовых количествах (содержание этих метаболитов в листьях, стеблях, корнях и корневищах растений редко превышает 0.0008% от сухой массы) [20, 23–25, 28, 29]. Имеющиеся в литературе данные позволяют выдвинуть предположение о запасной и/или транспортной функции гликозидов фенилэтиламидов гидроксикоричных кислот в клетках растений [29, 30].

Следует подчеркнуть, что все описанные в настоящей работе соединения обнаружены для вида *M. turcomanica* впервые, однако для их более точной структурной идентификации требуются дополнительные исследования.

Важно, что в результате проведенного анализа не удалось обнаружить в биомассе суспензионной культуры клеток *M. turcomanica* характерных для растений рода *Mandragora* spp. (и многих других представителей семейства *Solanaceae*) вторичных метаболитов – тропановых алкалоидов, кумаринов и/или витанолидов [10].

Таким образом, в настоящей работе впервые проведено подробное хромато-масс-спектрометрическое изучение вторичных метаболитов в биомассе суспензионной культуры клеток *M. turcomanica*. При этом идентифицированы как широко распространенные у растений соединения (амиды гидрокси-

коричных кислот с путресцином и ферулоилтирамин), так и весьма редкие метаболиты (гликозиды фенолэтиламидов гидроксикоричных кислот). Важно, что значительное структурное разнообразие гликозилированных фенолэтиламидов гидроксикоричных кислот обнаружено в биомассе суспензионной культуры клеток *M. turcomanica*, которая поддерживается в активно растущем состоянии более 30 лет [11]. Этот результат свидетельствует о сохранении в длительно культивируемых *in vitro* клетках растений способности к образованию весьма сложного набора вторичных метаболитов и противоречит сложившимся представлениям [3] о закономерностях специализированного метаболизма в культурах растительных клеток.

Работа по анализу биохимического состава культуры клеток выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований 18-54-06021 Аз\_а.

Работы по выращиванию культуры клеток проводили с использованием оборудования “Научно-производственного комплекса на основе разработки природосберегающей Hi-Tech биотехнологии получения высококачественного сырья фармацевтического и пищевого назначения с использованием культивируемых клеток и органов высших растений или микроводорослей”, включая оборудование Уникальных научных установок “Всероссийская коллекция культур клеток высших растений” и “Опытный биотехнологический комплекс” Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук (УНУ ОБК ИФР РАН и УНУ ВРККК ВР ИФР РАН) при финансовой поддержке Мегагранта Правительства Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1882).

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Носов А.М. Функции вторичных метаболитов растений *in vivo* и *in vitro* // Физиология растений. 1994. Т. 41. С. 873.
2. Nosov A.M., Popova E.V., Kochkin D.V. Isoprenoid production *via* plant cell cultures: biosynthesis, accumulation and scaling-up to bioreactors // Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology / Eds. Paek K.-Y. et al. Netherlands: Springer, 2014. P. 563.
3. Ramachandra Rao S., Ravishankar G.A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites // Biotechnol. Adv. 2002. V. 20. P. 101.
4. Kochkin D.V., Globa E.B., Demidova E.V., Gaisinsky V.V., Kuznetsov V.V., Nosov A.M. Detection of Taxuyunnanin C in Suspension Cell Culture of *Taxus canadensis* // Dokl. Biochem. Biophys. 2019. V. 485. № 1. P. 129.
5. Dettmer K., Aronov P.A., Hammock B.D. Mass spectrometry-based metabolomics // Mass Spectrom. Rev. 2007. V. 26. № 1. P. 51.
6. Yang W.Z., Ye M., Qiao X., Liu C.F., Miao W.J., Bo T., Tao H.Y., Guo D.A. A strategy for efficient discovery of new natural compounds by integrating orthogonal column chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry analysis: Its application in *Panax ginseng*, *Panax quinquefolium* and *Panax notoginseng* to characterize 437 potential new ginsenosides // Anal. Chim. Acta. 2012. V. 739. P. 56.
7. Chun S.C., Gopal J., Iyyakannu S., Muthu M. An analytical retrospection of mass spectrometric tools established for plant tissue culture: Current endeavours and future perspectives // TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2020. V. 126. P. 115843. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115843>
8. Akhani H., Ghorbani A.B. *Mandragora turcomanica* (Solanaceae) in Iran: A new distribution record for an endangered species // Systematics and Biodiversity. 2003. V. 1. № 2. P. 177.
9. Sinev I.E. The history of *Mandragora turkomanica* (Solanaceae) // Isr. J. Plant Sci. 2016. V. 63. № 3. P. 176.
10. Hanuš L.O., Řezanka T., Spížek J., Dembitsky V.M. Substances isolated from *Mandragora* species // Phytochemistry. 2005. V. 66. № 20. P. 2408.
11. Pakhlavouni I.K., Khaibullina L.A., Serebryakova V.N. Carotenoid composition and chloroplast ultrastructure in two cell lines of *Mandragora turcomanica* (Solanaceae) // Russ. J. Plant Physiol. 2000. V. 47. P. 38.
12. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473.
13. ВРККК ВР. *Mandragora turcomanica* Mizgir. // Паспорт Всероссийской коллекции культур клеток высших растений: ИФР РАН, 1984.
14. Abrankó L., García-Reyes J.F., Molina-Díaz A. In-source fragmentation and accurate mass analysis of multiclass flavonoid conjugates by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry // J. Mass Spectrom. 2011. V. 46. № 5. P. 478.
15. Kochkin D.V., Galishev B.A., Glagoleva E.S., Titova M.V., Nosov A.M. Rare triterpene glycoside of ginseng (ginsenoside malonyl-Rg1) detected in plant cell suspension culture of *Panax japonicus* var. *repens* // Russ. J. Plant Physiol. 2017. V. 64. P. 649.
16. Brenton A.G., Godfrey A.R. Accurate mass measurement: terminology and treatment of data // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2010. V. 21. № 11. P. 1821.
17. Nikolić D., Gödecke T., Chen S.-N., White J., Lankin D.C., Pauli G.F., van Breemen R.B. Mass spectrometric dereplication of nitrogen-containing constituents of black cohosh (*Cimicifuga racemosa* L.) // Fitoterapia. 2012. V. 83. № 3. P. 441.
18. Zhang J., Guan S., Sun J., Liu T., Chen P., Feng R., Chen X., Wu W., Yang M., Guo D.A. Characterization and profiling of phenolic amides from *Cortex Lycii* by ultra-high performance liquid chromatography coupled with LTQ-Orbitrap mass spectrometry // Anal. Bioanal. Chem. 2015. V. 407. № 2. P. 581.

19. Li Z., Zhao C., Zhao X., Xia Y., Sun X., Xie W., Ye Y., Lu X., Xu G. Deep annotation of hydroxycinnamic acid amides in plants based on ultra-high-performance liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry and its *in silico* database // *Anal. Chem.* 2018. V. 90. № 24. P. 14321.
20. Yim S.-H., Kim H., Jeong N., Deok K., Lee Y.J., Cho S., Lee I.-S. Novel phenolic and phenolic amide allosides structure-guided identification of novel phenolic and phenolic amide allosides from the rhizomes of *Cimicifuga heracleifolia* // *Bull. Korean Chem. Soc.* 2012. V. 33. P. 1253.
21. Sun J., Song Y.L., Zhang J., Huang Z., Huo H.X., Zheng J., Zhang Q., Zhao Y.F., Li J., Tu P.F. Characterization and quantitative analysis of phenylpropanoid amides in eggplant (*Solanum melongena* L.) by high performance liquid chromatography coupled with diode array detection and hybrid ion trap time-of-flight mass spectrometry // *J. Agric. Food Chem.* 2015. V. 63. № 13. P. 3426.
22. Geng P., Harnly J.M., Sun J., Zhang M., Chen P. Feruloyl dopamine-O-hexosides are efficient marker compounds as orthogonal validation for authentication of black cohosh (*Actaea racemosa*) – an UHPLC-HRAM-MS chemometrics study // *Anal. Bioanal. Chem.* 2017. V. 409. № 10. P. 2591.
23. Zhang F., Han L.-F., Pan G.-X., Peng S., Ndagijimana A. A new phenolic amide glycoside from *Cimicifuga dahurica* // *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica.* 2013. V. 48. P. 1281.
24. Yahagi T., Yamashita Y., Daikonnya A., Wu J.B., Kitanaoka S. New feruloyl tyramine glycosides from *Stephania hispidula* YAMAMOTO // *Chem. Pharm. Bull.* 2010. V. 58. № 3. P. 415.
25. Yang L., Jiang H., Wang Q.H., Yang B.Y., Kuang H.X. A new feruloyl tyramine glycoside from the roots of *Achyranthes bidentata* // *Chin. J. Nat. Med.* 2012. V. 10. № 1. P. 16.
26. Bassard J.E., Ullmann P., Bernier F., Werck-Reichhart D. Phenolamides: bridging polyamines to the phenolic metabolism // *Phytochemistry.* 2010. V. 71. № 16. P. 1808.
27. Edreva A.M., Velikova V.B., Tsonev T.D. Phenylamides in plants // *Russ. J. Plant Physiol.* 2007. V. 54. P. 287.
28. Wu P.L., Su G.C., Wu T.S. Constituents from the stems of *Aristolochia manshuriensis* // *J. Nat. Prod.* 2003. V. 66. № 7. P. 996.
29. Sun G., Strebl M., Merz M., Blamberg R., Huang F.C., McGraphery K., Hoffmann T., Schwab W. Glucosylation of the phytoalexin N-feruloyl tyramine modulates the levels of pathogen-responsive metabolites in *Nicotiana benthamiana* // *Plant J.* 2019. V. 100. № 1. P. 20.
30. Mhlongo M.I., Piater L.A., Madala N.E., Steenkamp P.A., Dubery I.A. Phenylpropanoid defences in *Nicotiana tabacum* cells: overlapping metabolomes indicate common aspects to priming responses induced by lipopolysaccharides, chitosan and flagellin-22 // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 3: e0151350. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151350>

## ОЦЕНКА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ С ПОМОЩЬЮ ЦИТОМЕТРИЧЕСКИХ И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ

© 2021 г. Е. С. Соломонова<sup>а</sup>, \*, А. И. Акимов<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

\*e-mail: solomonov83@mail.ru

Поступила в редакцию 09.12.2020 г.

После доработки 20.01.2021 г.

Принята к публикации 23.01.2021 г.

Исследована возможность применения флуорохромного красителя флуоресцеина диацетата (FDA) в комбинации с проточной цитометрией и коэффициента переменной флуоресценции хлорофилла *a* для оценки функционального состояния клеток микроводорослей в условиях накопительного роста культур и при вариабельности света и температуры от оптимальных до экстремальных уровней. Показано, что величина флуоресценции FDA является более консервативным параметром по сравнению с относительной переменной флуоресценцией хлорофилла *a*, ее заметные изменения связаны с необратимой потерей функциональной активности клеток водорослей и их гибелью, что позволяет использовать данный показатель в качестве маркера жизнеспособности водорослей при экстремальных условиях культивирования. Заметное снижение значений флуоресценции FDA сопряжено с наступлением глубокой стационарной фазы (фазы отмирания) роста водорослей, а также наблюдается при воздействии на клетки исследуемых культур высокой температуры (>25°C) и ингибирующей интенсивности света (1200 мкЭ/м<sup>2</sup> с<sup>-1</sup>).

**Ключевые слова:** микроводоросли, проточная цитометрия, накопительная культура, температура, интенсивность света, флуоресценция FDA, скорость роста, относительная переменная флуоресценция хлорофилла *a*

**DOI:** 10.31857/S0015330321050201

### ВВЕДЕНИЕ

Быстрая ответная реакция микроводорослей на изменение условий существования позволяет использовать их структурно-функциональные характеристики как чувствительные индикаторы экологического состояния водных биоценозов. Применение цитометрических и флуоресцентных показателей клеток водорослей в качестве экспресс-маркеров – практически неисследованный феномен, несмотря на его довольно широкое распространение и универсальность. Создание системы оперативного контроля функционального состояния фитопланктона позволит прогнозировать процессы формирования первичной продукции в море в условиях возрастающего антропогенного воздействия на морские биоценозы.

Метод проточной цитометрии в комбинации с флуорохромом флуоресцеином диацетатом (FDA) применяется для распознавания живых и мертвых клеток микроводорослей на основе проницаемо-

сти их клеточных мембран и для оценки ферментативной активности клеток, что открывает возможность поиска новых репрезентативных критериев определения функционального состояния водорослей. В состав FDA входит субстрат, специфичный к ферментам группы эстераз [1]. Его ферментный гидролиз приводит к высвобождению молекулы флуоресцеина и, как следствие, свечению клетки (эмиссия в зеленой области спектра). Однако чаще всего такой подход применяется для определения доли живых/мертвых клеток различных таксономических групп водорослей [1–4]. Нами впервые было предложено использовать удельную флуоресценцию FDA в качестве экспресс-маркера функционального состояния водорослей в условиях накопительного роста культуры [5]. В литературе практически не затрагиваются вопросы оценки роли основных физических факторов (температура и освещенность) в регулировании процессов, связанных с деятельностью внутриклеточных эстераз микроводорослей [3]. Встречаются единичные исследования, где изменение удельной флуоресценции FDA у водорос-

**Сокращение:** FDA – флуоресцеин диацетата.

лей рассматривается как отклик на действие токсических веществ. В основном это краткосрочные острые опыты, не связанные с длительным культивированием водорослей в ингибируемой среде [4, 6, 7].

Метод измерения относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* водорослей обладает высокой чувствительностью и позволяет быстро оценить ряд биофизических характеристик фитопланктона в режиме реального времени [8, 9]. Однако до сих пор слабо изученным остается вопрос влияния физических факторов среды на динамику переменной флуоресценции хлорофилла *a* [8, 10]. Несмотря на интенсивные исследования флуоресцентных характеристик, сведения о взаимосвязи относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* с основными структурными, внутриклеточными соотношениями водорослей и скоростью роста водорослей практически отсутствуют. В связи с этим, совершенствование существующих и развитие новых методов прямой детекции стрессового состояния клетки/сообщества — актуальная и востребованная прикладная задача.

Цель работы — оценка физиологического состояния микроводорослей при оптимальных и экстремальных условиях роста с помощью цитометрических и флуоресцентных показателей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объект исследования.** В качестве объекта исследования были использованы альгологически чистые культуры водорослей: отдел Bacillariophyta: *Phaeodactylum tricornerutum* (Bohlin), *Chaetoceros curvisetus* (Cleve); отдел Chlorophyta: *Chlorella vulgaris suboblonga* (Andreeva), *Dunaliella salina* (Teodoresco) из коллекции отдела экологической физиологии водорослей ИнБЮМ. Выбор видов обусловлен тем, что *Phaeodactylum tricornerutum*, *Chlorella vulgaris suboblonga* и *Dunaliella salina* обладают высокой жизнестойкостью при культивировании и часто используются в гидробиологических исследованиях в качестве модельных объектов, а *Chaetoceros curvisetus* является одним из широко распространенных представителей фитопланктона Черного моря.

*Phaeodactylum tricornerutum* — морской, солоноватоводный, эвригалитный вид, широко распространенный в морских и континентальных водоемах. Вид планктонный, встречается круглогодично, но преимущественно весной и осенью. Клетки одиночные, двух видов: слегка серповидно изогнутые и трехлучевые [11].

*Chaetoceros curvisetus* — неритический вид, широко распространенный в южных и умеренных морях. Распространен в Черном море у берегов и во всех бухтах, реже в северо-западном районе, осенью и весной в большом количестве, часто вызывает осеннее цветение, споры образует пре-

имущественно в октябре, иногда в заметном количестве ранней весной. Цепочки прямые, ширина 5–30 мкм. Створки эллиптические, слабо вогнутые, с выпуклиной на середине, загиб высокий, около 1/3 высоты клетки, поясок с узкой бороздкой по краю, высота клетки 12.5–30 мкм. Щетинки тонкие, отходят от приподнятых полюсов, скрещиваются у своего основания, направлены сначала перпендикулярно к оси цепочки, затем слегка склоняются к ее концам [11].

*Chlorella vulgaris suboblonga* — клетки эллипсоидные, 2.8–6.1 мкм длиной и 1.7–5.5 мкм шириной, при образовании автоспор 8.0 и 5.5 мкм, соответственно. Оболочка тонкая. Хлоропласт широкий поясковидный незамкнутый или корытовидный. Положение хлоропласта может быть ориентировано по отношению к длинной оси клетки продольно или поперечно. Автоспоры по 2–4, реже по 8, сразу после освобождения неправильно эллипсоидные. Цвет клеток как молодых, так и взрослых темно-зеленый [12].

*Dunaliella salina* — клетки водоросли разнообразной формы: овальные, эллипсоидные, яйцевидные, грушевидные, иногда шаровидные, цилиндрические или веретеновидные; радиально- или билатерально симметричные, редко дорсовентральные или слегка ассиметричные [13]. Размеры клеток разнообразны: их длина может колебаться от 2.8 до 40 мкм, ширина от 1.5 до 20 мкм, объем от 8 до 4500 мкм<sup>3</sup>. Наиболее подробные иллюстрации по изменчивости дуналиелл имеются в [13], где представлены материалы по гомологическим рядам модификационной изменчивости видов дуналиелл.

Во всех сериях экспериментов культуры выращивали в конических колбах объемом 250 мл (объем культур в колбах составлял 150 мл).

**Накопительный режим культивирования.** Исследовали поведение водорослей и флуоресцентные показатели в накопительном режиме роста при усилении дефицита азота. Культуру *P. tricornerutum* выращивали в двух повторностях при температуре 20°C и интенсивности света 34 мкЭ/м<sup>2</sup> с<sup>-1</sup> в течение 14 сут на среде f/2 [14] с двукратно уменьшенным содержанием азота. Культуру *C. vulgaris suboblonga* также выращивали в двух повторностях при температуре 18°C и интенсивности света 43 мкЭ/м<sup>2</sup> с<sup>-1</sup> в течение 23 сут на среде f/2 с двукратно уменьшенным содержанием азота. Интенсивность света определяли внутри колб зондирующим 4П датчиком квантометра QSL 2101 (“Biospherical Instruments Inc.”, США), диапазон которого составляет 400–700 нм (ФАР). Концентрационное тушение флуоресценции в накопительных культурах устраняли путем разбавлением пробы непосредственно перед измерением. Осуществляли контроль по измерению кислорода в среде с помощью кислородомера КЛ 115. Мини-

мальное содержание кислорода было не ниже 4 мгО<sub>2</sub>/л.

**Световой фактор.** Для исследования влияния светового фактора на функциональные показатели *P. tricornutum* и *D. salina* культуры адаптировали дискретно к освещенностям от 14 до 1720 мкЭ/м<sup>2</sup> с<sup>-1</sup> при температуре 1720°C в течение периода времени, достаточного для соответствующей стабилизации роста при данной освещенности (3–7 сут). Облучение осуществлялось светодиодами белого света (4000 К), различные уровни которого достигались изменением расстояния до источника света и применением нейтральных светофильтров.

**Температурный фактор.** Выращивание водорослей *P. tricornutum* и *S. curvisetus* проводили в диапазоне температур от 3 до 27°C при постоянной освещенности 34 мкЭ/м<sup>2</sup> с<sup>-1</sup> в течение периода времени, достаточного для соответствующей стабилизации роста при данной температуре (3–6 сут). Для создания необходимых температурных условий использовали термостатированный бокс, точность поддержания температуры +0.1°C.

Концентрация клеток в культурах поддерживалась примерно на одном уровне в экспоненциальной фазе роста путем периодического (один раз в сутки или реже для слаборастущих культур) разбавления свежей питательной средой при исследовании влияния температурного и светового факторов. Текущий контроль осуществлялся путем измерения оптической плотности суспензии. Оптическая плотность суспензии определялась на спектрофотометре СФ 26 ЛОМО, на длине волны 750 нм в 10-сантиметровой цилиндрической кювете, закрепляемой внутри кюветного отделения в специально изготовленном держателе. Возможность использования оптической плотности как показателя биомассы для разных видов была исследована ранее; получена линейная зависимость между этой величиной и концентрацией клеток [15].

Величина рН культуральной среды составляла 8.2–8.5.

Удельную скорость роста микроводорослей определяли по формуле [16]:

$$\mu = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t}, \quad (1)$$

где:

$\mu$  – удельная скорость роста, сут<sup>-1</sup>;

$N_1$  и  $N_2$  – исходная концентрация клеток и ее количество через время  $t$ , кл/мл;

$t$  – время между измерениями, сут.

Для цитометрического анализа из культивируемых сосудов отбирали пробы объемом 3 мл. Пробы исследовали с помощью проточного цитометра Cytomics TM FC 500 (“Beckman Coulter”, США), оборудованного 488 нм однофазным аргон-

новым лазером. Окрашивание водорослей ви- тальным красителем флуоресцеином диацетатом (FDA) производили по протоколу, опубликованному в работе [17]. Метаболическую активность и содержание пигментов в клетках оценивали на двух параметрических цитограммах по флуоресценции FDA (канал FL1 в зеленой области спектра, 525 нм) и автофлуоресценции (FL4 в красной области спектра, 675 нм) на безразмерных логарифмических шкалах. С вариантом иллюстраций можно ознакомиться в работе [17], выполненной с участием авторов. Рассчитывали среднее значение аккумулярованной флуоресценции FDA на клетку, обозначив данный параметр, как *FDAfl*.

Изменение переменной флуоресценции хлорофилла *a* (максимальной квантовой эффективности ФС II) (в литературе встречаются определения: эффективность первичного разделения зарядов, КПД использования световых квантов и др.), под которой далее по тексту будет пониматься коэффициент относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* [8, 9, 18], определяли на флуориметре МЕГА 25 с возбуждающим излучением на длине волны ~ 455 нм [19], разработанным на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова по формуле:

$$F_v/F_m = \frac{F_m - F_0}{F_m}, \quad (2)$$

где:

$F_m$  – максимальная флуоресценция после серии световых вспышек, насыщающих реакционные центры фотосинтеза;

$F_0$  – величина флуоресценции при открытых реакционных центрах.

Перед измерением пробы выдерживали 15 мин в темноте при необходимой температуре. Принцип действия флуориметра основан на оптическом явлении флуоресценции хлорофилла – свечении вещества в момент воздействия возбуждающим светом. Индукция флуоресценции регистрируется при фиксированном значении интенсивности возбуждающего света около 5000 мкмоль/м<sup>2</sup> с<sup>2</sup>. Предел допускаемой относительной погрешности измерений не более ± 10%. Управление работой флуориметра осуществляется от персонального компьютера при помощи специализированной программы МЕГА25.

Статистическая обработка данных выполнялась по стандартным программным пакетам Microsoft Excel 7.0, Statistica-5, Grapher-9, Sigma Plot для персонального компьютера. Все опыты были выполнены в трех биологических и трех аналитических повторностях. В таблицах и графиках представлены средние значения и их стандартные отклонения. Достоверность различий между средними значениями оценена по t-критерию Стьюдента при  $P \leq 0.05$ .

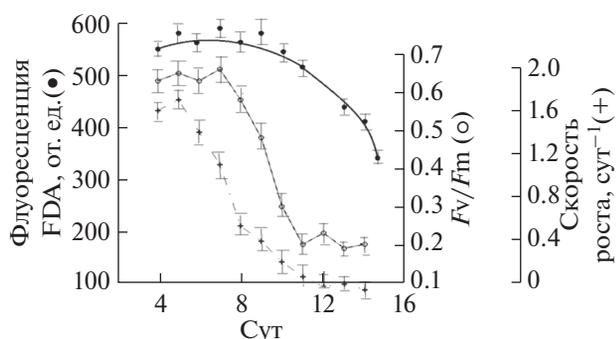


Рис. 1. Динамика изменений флуоресценции FDA (*FDAfl*), параметра  $F_v/F_m$  и удельной скорости роста культуры *Phaeodactylum tricornutum* в накопительном режиме

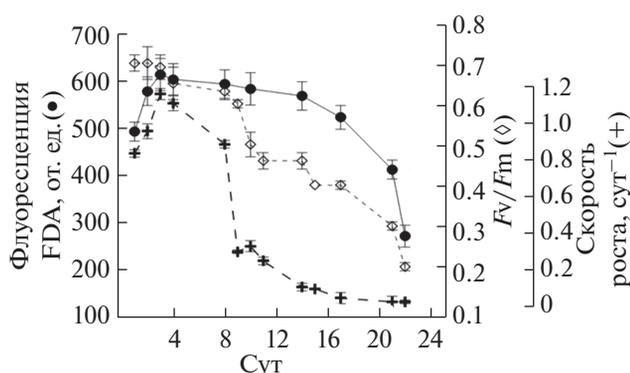


Рис. 2. Динамика изменений флуоресценции FDA (*FDAfl*), параметра  $F_v/F_m$  и удельной скорости роста культуры *Chlorella vulgaris suboblunga* в накопительном режиме

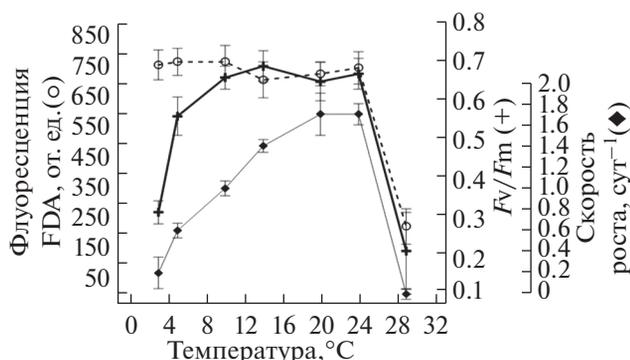


Рис. 3. Зависимость параметров *FDAfl* активности,  $F_v/F_m$  и удельной скорости роста от температуры у *Phaeodactylum tricornutum*

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Накопительный режим культивирования

На рис. 1 и 2 представлена временная динамика параметров флуоресценции *FDAfl*, параметра

$F_v/F_m$  и скорости роста культур *P. tricornutum* и *C. vulgaris suboblunga* в условиях накопительного роста водорослей.

Максимальные значения исследуемых параметров наблюдали в экспоненциальной фазе роста, на 2–3 сут эксперимента для *C. vulgaris suboblunga* и на 4–6 сут для *P. tricornutum*, после лаг-периода, связанного с сильным разведением культур. Затем наблюдалось быстрое падение удельной скорости роста  $\mu$  водорослей и коэффициента относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a*. Значения флуоресценции FDA оставались высокими до наступления стационарной фазы роста. По мере развития стационарной фазы (старение культуры), на фоне снижения концентрации клеток происходило более быстрое падение показателя флуоресценции FDA, однако не столь значительное, как для параметров  $F_v/F_m$  и  $\mu$ , соответственно.

### Температурный фактор

Данные на рисунках 3 и 4 показывают изменения значений коэффициента относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a*, флуоресценции FDA (*FDAfl*) и удельной скорости роста водорослей при их культивировании в условиях различных температур. Температурная зависимость удельной скорости роста водорослей *P. tricornutum* и *C. curvisetus* имела одновершинный характер, с максимумом при 20–24°C и сильным ингибированием при 27°C. Значения параметров *FDAfl* и  $F_v/F_m$  у исследуемых видов водорослей сохранялись на высоком, относительно постоянном уровне в диапазоне температур 5–24°C. При температуре 27°C *P. tricornutum* и *C. curvisetus* сильно деградировали, что приводило к остановке роста водорослей и паданию значений как активности внутриклеточных эстераз, так и эффективности переноса энергии ФС II. Пролонгированное воздействие этой температуры имело летальный характер.

Если сравнивать значения удельной скорости роста водорослей и параметра  $F_v/F_m$  в крайних температурных зонах, то наблюдается формально одинаковое поведение: резкое снижение данных показателей. Однако при высоких температурах снижение  $F_v/F_m$ , очевидно, отражает частичную (или полную) гибель клеток и утрату ими фотосинтетической активности, а при низких температурах снижение относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* нельзя объяснить таким же образом, так как клетки сохраняют жизнеспособность и быстро восстанавливаются при повышении температуры. Данный тезис подтверждается полученными значениями флуоресценции FDA. В отличие от относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a*, параметр *FDAfl* сохранял высокие значения при низкой темпера-

туре, что косвенно подтверждает поддержание жизнеспособности водорослей в этих условиях. При этом флуоресценция FDA имела минимальные значения при высоких температурах ( $>25^{\circ}\text{C}$ ). Температуры, превышающие верхнюю границу толерантной зоны, можно рассматривать как более жесткий фактор, приводящий к возможной гибели водорослей.

#### Световой фактор

Чтобы определить влияние светового фактора на флуоресценцию FDA, культуры *P. tricornutum* (рис. 5) и *D. salina* (рис. 6) выращивали в широком диапазоне интенсивности света. В диапазоне от 14 до  $150\text{ мкЭ/м}^2\text{ с}^{-1}$  у *P. tricornutum* сохранялись высокие значения квантовой эффективности ФС2 (0.63–0.70), у *D. salina* данный показатель имел максимальные значения при интенсивности света от 170 до  $600\text{ мкЭ/м}^2\text{ с}^{-1}$ . При освещенности свыше  $150\text{ мкЭ/м}^2\text{ с}^{-1}$  наблюдалось постепенное снижение относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* у *P. tricornutum*, падение значений удельной скорости роста водорослей отмечено при более высоких значениях освещенности – свыше  $600\text{ мкЭ/м}^2\text{ с}^{-1}$ . Снижение значений  $F_v/F_m$  у *D. salina* отмечено при освещенности свыше  $600\text{ мкЭ/м}^2\text{ с}^{-1}$  и было сопряжено со снижением значений удельной скорости роста водорослей. При интенсивности света  $1200\text{ мкЭ/м}^2\text{ с}^{-1}$  наблюдали падение показателей относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* и ингибирование скорости роста у исследуемых видов водорослей.

Флуоресценция FDA имела относительно высокие постоянные значения практически во всем световом диапазоне выращивания как у *P. tricornutum*, так и *D. salina*. Действие интенсивности света  $1200\text{ мкЭ/м}^2\text{ с}^{-1}$  приводило к резкому падению параметра FDAfl у *P. tricornutum*, тогда как культура *D. salina* сохраняла высокие значения флуоресценции FDA при данной освещенности. Это подтверждается высокой подвижностью клеток *D. salina*, наблюдаемой под электронным микроскопом. Падение параметра FDAfl у *D. salina* отмечено при интенсивности света  $1600\text{ мкЭ/м}^2\text{ с}^{-1}$ , относительная переменная флуоресценция хлорофилла *a* также имела минимальные значения (0.3) в данных условиях роста водорослей.

Уровень световой энергии выше  $600\text{ мкЭ/м}^2\text{ с}^{-1}$  может считаться избыточным (адаптивное снижение удельного содержания хлорофилла), а затем и ингибирующим  $900\text{--}1200\text{ мкЭ/м}^2\text{ с}^{-1}$ , вызывающим интенсивное фотоокисление и деструкцию как светопоглощающих пигментов, так и реакционных центров [20, 21].

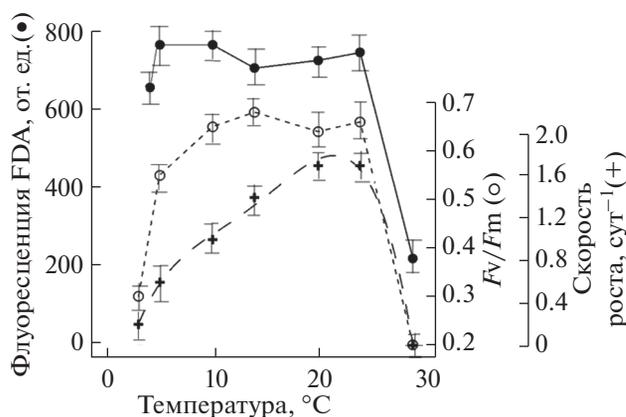


Рис. 4. Зависимость параметров FDAfl активности,  $F_v/F_m$  и удельной скорости роста от температуры у *Chaetoceros curvisetus*

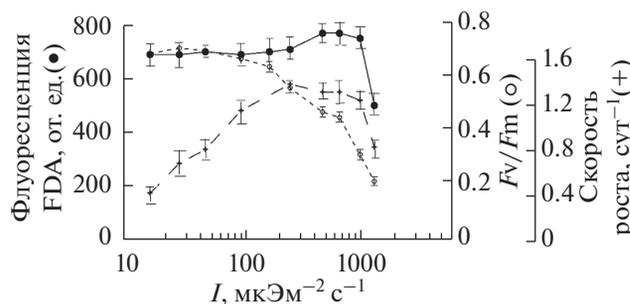


Рис. 5. Зависимость параметров FDAfl активности,  $F_v/F_m$  и удельной скорости роста от интенсивности света у *Phaeodactylum tricornutum*

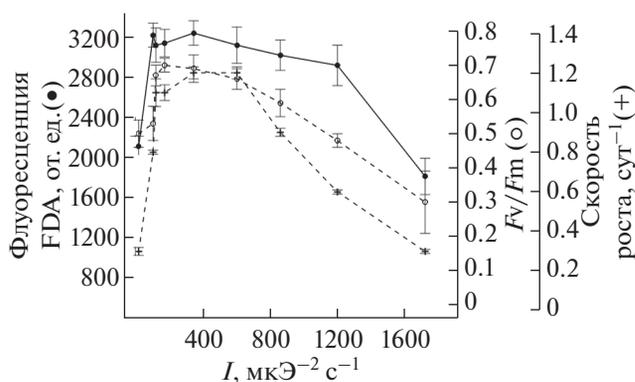


Рис. 6. Зависимость параметров FDAfl активности,  $F_v/F_m$  и удельной скорости роста от интенсивности света у *Dunaliella salina*

## ОБСУЖДЕНИЕ

Маркерами функционального состояния водорослей могут выступать структурные и внутриклеточные элементы клетки, такие как мембрана и мембранная проводимость, протеины (ферменты)

и их активность, рибосомы и их функциональность, ферментативные реакции, накопление АТФ, морфологические признаки, а также более традиционные: скорость роста водорослей, численность клеток и биомасса, соотношение основных внутриклеточных компонентов.

На сегодняшний день в морской гидробиологии, а также в исследованиях по интенсивному культивированию водорослей, все чаще начинают применяться экспресс-методы оценки функционального состояния фитопланктона и его продукционного потенциала под влиянием внешних условий, в том числе в связи с антропогенными факторами среды. Такими методами являются: метод проточной цитометрии в комбинации с различными витальными красителями и метод переменной флуоресценции хлорофилла *a*, который дает возможность получать информацию о количестве и активности фототрофных организмов, а также по характеристикам состояния фотосинтетического аппарата оценивать физиологическое состояние клеток водорослей и судить о качестве водной среды [22, 23]. В результате появляется возможность поиска новых более консервативных критериев, отражающих функциональное состояние водорослей. К таким критериям можно отнести интегральные показатели метаболической активности клеток, реализуемые путем окраски суспензии клеток водорослей витальными красителями, например, диацетатом флуоресцеина, карбоксифлуоресцеином диацетатом (сFDA) и кальцеином АМ [1, 2, 24, 25], и коэффициент относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a*, характеризующий эффективность переноса и утилизацию энергии в первичных фотохимических процессах [18, 22].

В данной работе рассмотрено влияние абиотических факторов среды (свет, температура и содержание биогенных элементов в среде) на флуоресценцию флуоресцеина диацетата (FDA), удельную скорость роста водорослей и коэффициент относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a*. Если влияние описанных в работе факторов на рост водорослей и параметр  $F_v/F_m$  многократно исследовалось ранее [18, 26–28], то данных о световой и температурной зависимости флуоресценции FDA не удалось найти в литературе.

В процессе накопительного роста водорослей *P. tricornutum* и *C. vulgaris suboblonga* их функциональное состояние изменялось в зависимости от условий обеспеченности клеток элементами минерального питания. При увеличении плотности культуры концентрация минерального азота в среде снижалась, что приводило к замедлению роста водорослей и снижению значений коэффициента относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a*. Характер наблюдаемых изме-

нений удельной скорости роста и параметра  $F_v/F_m$  аналогичен был тем, которые отмечаются в литературе в экспериментах при дефиците биогенных элементов в среде [29, 30]. Величина  $FDA/fl$  сохраняла высокие значения в широком диапазоне накопительного режима вплоть до полной остановки роста и последующего лизиса клеток исследуемых видов водорослей на поздней стадии стационарной фазы.

Результаты исследований показали, что факторы, приводящие к снижению удельной скорости роста водорослей как в условиях накопительного роста, так и в результате действия различной интенсивности света и температур мало влияли на значение флуоресценции FDA, хотя воздействие условий стационарного состояния, высокой освещенности и высокой температуры наблюдалось. Глубокое стационарное состояние культур (фаза отмирания), высокая освещенность (свыше  $1200 \text{ мкЭ/м}^2 \text{ с}^{-1}$ ) и температура больше  $25^\circ\text{C}$  приводили к снижению удельной активности внутриклеточных эстераз. Наибольшее падение флуоресценции FDA наблюдалось при воздействии высоких температур и было связано с уже необратимой деструкцией клеток и отмиранием водорослей.

Если рассматривать причины отсутствия значительных изменений флуоресценции FDA в широком диапазоне исследуемых факторов, то здесь можно выдвинуть несколько предположений. Во-первых, возможно, используемые в работе виды водорослей обладают высокой толерантностью и пластичностью к изменениям условий внешней среды и способностью сохранять высокую функциональную активность в этих условиях. Другая возможная причина полученных высоких значений флуоресценции FDA при воздействии на клетки водорослей стресс-факторов заключается в стимуляции активности внутриклеточных эстераз с целью адаптации чего, кого? к неблагоприятным условиям окружающей среды. Подобная теория ранее рассматривалась в исследованиях микроводорослей, подверженных воздействию ряда загрязняющих веществ, например, паракват или медь [4–6]. В-третьих, флуоресценция FDA устойчива к факторам среды, если лимитирование роста водорослей имеет обратимый характер, и уровень воздействующего фактора не приводит к необратимой деструкции клеток и гибели исследуемого объекта.

Нам представляется, что флуоресценция FDA является консервативным параметром, отражающим функциональное состояние клеток водорослей, и ее заметное изменение наблюдается при необратимом воздействии факторов. В подтверждение данного тезиса можно привести работы, где культуры водорослей подвергали воздействию различного рода токсичных веществ. Результаты, отражен-

ные в данных исследованиях, также показали, что флуоресценция FDA не коррелирует с теми функциональными параметрами клеток водорослей, которые способны к восстановлению своих показателей в случае изменений условий окружающей среды в сторону оптимальных значений для роста [4–6].

Таким образом, предложенный консервативный параметр – флуоресценция FDA, отражающая изменение функционального состояния водорослей в результате необратимых воздействий окружающей среды, – может быть использован для: (а) оперативной интегральной оценки состояния и функционирования морских экосистем в связи с естественными и антропогенными влияниями; (б) индикации летальных воздействий на клетки водорослей; (в) контроля санитарно-биологического состояния прибрежных вод. Это позволит избежать трудоемких и длительных во времени традиционных методов оценки функционального состояния водорослей и повысить качество и оперативность диагностирования стрессовых состояний фитопланктонного сообщества.

Работа выполнена в рамках темы государственного задания № АААА-А18-118021490093-4 “Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом”.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dorsey J.* Rapid analytical technique for the assessment of cell metabolic activity in marine microalgae // *Cytometry Part A.* 1989. V. 10. P. 622. <https://doi.org/10.1002/cyto.990100518>
2. *Onji M., Sawabe Y., Ezura T.* An evaluation of viable staining dyes suitable for marine phytoplankton // *Bull. Fac. Fish.* 2000. V. 51. P. 151.
3. *Geary S., Ganf G., Brookes J.* The use of FDA and flow cytometry to measure the metabolic activity of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* // *SIL Proceedings, 1922-2010* 1998. V. 26. P. 2367. <https://doi.org/10.1080/03680770.1995.11901173>
4. *Prado R., Rioboo C., Herrero C., Cid A.* Characterization of cell response in *Chlamydomonas moewusii* cultures exposed to the herbicide paraquat: Induction of chlorosis // *Aquat. Toxicol.* 2011. V. 102. P. 10. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.12.013>
5. *Соломонова Е., Акимов А.* Оценка функционального состояния культуры *Chlorella vulgaris suboblonga* методами проточной цитометрии и переменной флуоресценции // *Мор. экол. журн.* 2014. Т. 1. С. 73.
6. *Peterson S., Stauber L.* New algal enzyme bioassay for the rapid assessment of aquatic toxicity // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1996. V. 56. P. 750. <https://doi.org/10.1007/s001289900110>
7. *Franqueira D., Orosa M., Torres E., Herrero C., Cid A.* Potential use of flow cytometry in toxicity studies with microalgae // *Sci. Total Environ.* 2000. V. 247. P. 119. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00483-0](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00483-0)
8. *Falkowski P., Kolber Z.* Variations in chlorophyll fluorescence yields in phytoplankton in the world oceans // *Funct. Plant Biol.* 1995. V. 22. P. 341. <https://doi.org/10.1071/PP950341>
9. *Owens T.G.* Energy transformation and fluorescence in photosynthesis. In: *Particle Analysis in Oceanography* / Ed. Demers S. Berlin, Heidelberg: Springer, 1991. P. 101. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-75121-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-642-75121-9_6)
10. *Fujiki T., Taguchi S.* Variability in chlorophyll a specific absorption coefficient in marine phytoplankton as a function of cell size and irradiance // *J. Plankton Res.* 2002. V. 24. P. 859. <https://doi.org/10.1093/plankt/24.9.859>
11. *Прошкина-Лавренко А.И.* Диатомовые водоросли планктона Черного моря. Москва: Изд-во АН СССР, 1955. 222 с.
12. *Грбарник В.И., Карелин Н.В., Богданов Н.И.* Патент РФ 2644653 С1, 2018.
13. *Масюк Н.П.* Масова культура каротиноносної водорості *Dunaliella salina* Teod. // *Укр. ботан. журн.* 1966. Т. 23. С. 12.
14. *Guillard R., Ryther J.* Studies of marine planktonic diatoms: *I. Cyclotella Nana* Hustedt, and *Detonula Confervacea* (CLEVE) Gran // *J. Can. Microbiol.* 1962. V. 8. P. 229. <https://doi.org/10.1139/m62-029>
15. *Шоман Н., Акимов А.* Влияние фотоадаптации на удельную скорость роста и соотношение органического углерода к хлорофиллу *a* у диатомовой водоросли *Phaeodactylum tricorutum* // *Мор. экол. журн.* 2013. Т. 12. С. 97.
16. *Финенко З.З., Ланская Л.А.* Рост и скорость деления водорослей в лимитированных объемах воды // *Экологическая физиология морских планктонных водорослей (в условия культур)* / Под ред. К.М. Хайлова. Киев: Наукова думка, 1971. С. 22.
17. *Соломонова Е., Муханов В.* Оценка доли физиологически активных клеток в накопительных культурах *Phaeodactylum tricorutum* и *Nitzschia sp* с помощью проточной цитометрии // *Мор. экол. журн.* 2011. Т. 10. С. 67.
18. *Kromkamp J., Barranguet C., Peene J.* Determination of microphytobenthos PSII quantum efficiency and photosynthetic activity by means of variable chlorophyll fluorescence // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1998. V. 162. P. 45.
19. *Pogosyan S., Matorin D.* Variability in the condition of the photosynthetic system of the Black Sea phytoplankton // *Oceanology.* 2005. V. 45. P. 139.
20. *Kok B., Gassner E., Rurainski H.* Photoinhibition of chloroplast reactions // *Photochem. Photobiol.* 1956.

- V. 4. P. 215.  
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1965.tb05739.x>
21. *Powles S.B.* Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light // *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1984. V. 35. P. 15.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.pp.35.060184.000311>
  22. *Antal T., Venediktov P., Matorin D., Ostrowska M., Wozniak B., Rubin A.* Measurement of phytoplankton photosynthesis rate using a pump-and-probe fluorometer // *Oceanology.* 2001. V. 43. P. 291.
  23. *Beutler M., Wiltshire K., Meyer B., Moldaenke C., Luring C., Meyegho M., Hansen Ansen U., Dau H.* A fluorometric method for the differentiation of algal populations in vivo and in situ // *Photosynth. Res.* 2000. V. 72. P. 39.
  24. *Garvey M., Moriceau B., Passow U.* Applicability of the FDA assay to determine the viability of marine phytoplankton under different environmental conditions // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2007. V. 352. P. 17.  
<https://doi.org/10.3354/meps07134>
  25. *Peperzak L., Brussaard C.* Flow cytometric applicability of fluorescent vitality probes of phytoplankton // *J. Phycol.* 2011. V. 47. P. 692.  
<https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.00991.x>
  26. *Claquin P., Probert I., Lefebvre S., Veron B.* Effects of temperature on photosynthetic parameters and TEP production in eight species of marine microalgae // *Aquat. Microb. Ecol.* 2008. V.51. P. 1.  
<https://doi.org/10.3354/ame01187>
  27. *Chalifour A., Juneau P.* Temperature-dependent sensitivity of growth and photosynthesis of *Scenedesmus obliquus*, *Navicula pelliculosa* and two strains of *Microcystis aeruginosa* to the herbicide atrazine // *Aquat. Toxicol.* 2011. V. 103. P. 9.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.01.016>
  28. *Kulk G., Poll W. van de, Visser R., Buma A.* Low nutrient availability reduces high-irradiance-induced viability loss in oceanic phytoplankton // *Limnol. Oceanogr.* 2013. V. 58. P. 1747.  
<https://doi.org/10.4319/lo.2013.58.5.1747>
  29. *Franklin D., Berges J.* Mortality in cultures of the dinoflagellate *Amphidinium carterae* during culture senescence and darkness // *Proc. R. Soc. London, Ser. B.* 2004. V. 271. P. 2099.  
<https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2810>
  30. *Parkhill J., Maillet G., Cullen J.* Fluorescence-based maximal quantum yield for PS II as a diagnostic of nutrient stress // *J. Phycol.* 2001. V. 37. P. 517.  
<https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.037004517.x>