



Журналу 70 лет!

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Генетические подходы
в решении вопросов селекции,
физиологии и молекулярной
биологии растений



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 71, номер 2, 2024

«Генетические подходы в решении вопросов селекции,
физиологии и молекулярной биологии растений»
(по материалам конференции PlantGen2023, Казань, 10–15 июля 2023 г.)

ОБЗОРЫ

- Современное состояние лектинологии растений
Н. В. Петрова, А. Р. Агълямова, Н. Е. Мокшина, Т. А. Горшкова 115
- Генетические механизмы регуляции обновления клеток корневого чехлика у *Arabidopsis thaliana* L.
В. А. Черенко, Н. А. Омелянчук, Е. В. Землянская 135
- N-гликозилирование растительных белков
И. А. Ларская, Е. О. Федина, П. В. Микшина, Т. А. Горшкова 149

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Альфа- и бета-экспансины, экспрессирующиеся в различных зонах растущего корня кукурузы
Т. А. Горшкова, Н. В. Шилова, Л. В. Козлова, О. В. Горшков, А. Р. Назипова, А. Р. Агълямова, С. М. Полякова, А. Ю. Нокель, В. В. Головченко, П. В. Микшина, О. А. Патова, Н. В. Бовин 166
- Характеристика стрессоустойчивой трансгенной линии пшеницы, сверхэкспрессирующей ген фермента биосинтеза жасмонатов, 12-оксофитодиеноатредуктазы *AtOPR3*
Д. Н. Мирошниченко, А. В. Пиголев, К. Г. Тихонов, Е. А. Дегтярёв, Е. Ф. Лещенко, В. В. Алексеева, А. С. Пушин, С. В. Долгов, А. Баснет, Д. П. Горбач, Т. С. Леонова, А. А. Фролов, Т. В. Савченко 181
- Physcomitrium patens* — модель для изучения эволюции белков с лектиновыми доменами у растений
А. Р. Агълямова, А. Р. Хакимова, О. В. Горшков, Т. А. Горшкова 193
- Биохимическая, генетическая и цифровая оценка зерна сортов озимой мягкой пшеницы с различным индексом прорастания
А. В. Федяева, С. Д. Афонникова, Д. А. Афонников, О. Г. Смирнова, В. Н. Деева, А. И. Прянишников, Е. А. Салина 205
- Метаболизм каллозы в волокнах льна при гравииответе: анализ экспрессии генов
Н. Н. Ибрагимова, Н. Е. Мокшина 216
- Получение и первичная оценка фенотипа тополя берлинского, трансформированного геном *AtGA20ox1*
В. В. Павличенко, М. В. Протопопова 228
- Влияние спектрального состава световой среды на фотосинтетические, электро- и морфофизиологические показатели редиса в условиях светокультуры
Т. Э. Кулешова, П. В. Желначева, Е. М. Эзерина, В. Е. Вертебный, Ю. В. Хомяков, Г. Г. Панова, А. А. Кочетов, Н. Г. Синявина 243

УДК 581.1

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ЛЕКТИНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

© 2024 г. Н. В. Петрова^{а,*}, А. Р. Агьямова^а, Н. Е. Мокшина^а, Т. А. Горшкова^а^аКазанский институт биохимии и биофизики Федерального исследовательского центра

“Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия

*e-mail: npetrova@inbox.ru

Поступила в редакцию 03.09.2023 г.

После доработки 04.10.2023 г.

Принята к публикации 05.10.2023 г.

Лектины представляют собой группу белков, широко распространенных во всех царствах живой природы, но безусловными “чемпионами” по многочисленности и разнообразию лектинов являются растения. Фундаментальное свойство обратимо связываться со специфическими углеводами делает лектины важными участниками системы “гликокода”, которая в растительном организме с его невероятным углеводным разнообразием имеет особое функциональное значение. Структурное разнообразие лектинов служит основой их многочисленных функций, включающих передачу сигналов, связанных с ростом и развитием, а также с реакциями растений на биотические и абиотические раздражители. В обзоре представлена ретроспектива развития лектинологии растений и современные представления о классификации растительных лектинов, их локализации, известных и потенциальных функциях.

Ключевые слова: белок-углеводные взаимодействия, растительные лектины, рецепторные киназы, субклеточная локализация

DOI: 10.31857/S0015330324020011, **EDN:** OCCUCL

ВВЕДЕНИЕ

Растительные лектины являются весьма обширной группой белков, распознающих углеводы, что привлекает к ним особый интерес гликобиологов растений. История изучения лектинов как отдельного класса белковых молекул с особыми свойствами началась с описания растительного белка рицина в 1888 г. Это крайне токсичное вещество, выделенное из семян клещевины (*Ricinus communis*), используется растением в качестве защитного агента против травоядных организмов. В 1995 г. в статье Reumans и Van Damme было предложено определение растительных лектинов, которое описывает их как “все растительные белки, обладающие по крайней мере одним некаталитическим доменом, который обратимо связывается с конкретным моно- или олигосахаридом” [1]. В постгеномную эру, после того как стали доступны полные последовательности геномов многих растений и проведен биоинформатический анализ после-

довательностей белков с лектиновыми доменами, было выявлено, что большинство лектинов растений представляют собой белки, в которых лектиновый домен связан с одним или несколькими белковыми доменами с другой функцией. Разные лектиновые домены могут быть скомбинированы, например, с доменом протеинкиназы, доменом F-box, доменом гликозидгидролазы (GH) [2, 3]. Эти данные внесли уточнения в определение растительных лектинов, согласно которому все белки, которые содержат один или несколько лектиновых доменов или имеют доменную архитектуру, включающую один или несколько лектиновых доменов в сочетании с другими белковыми доменами, могут рассматриваться как лектины [4]. Лектиновый домен может специфично и обратимо связывать углеводы, но должен быть лишен ферментативной активности. Определение лектиновых доменов существенно перекликается с определением углевод-связывающих модулей (СВМ — от carbohydrate binding module). Наиболее известным примером белков с СВМ служат целлюлазы, ксиланазы, хитиназы [5]. Исторически белки с СВМ рассматриваются отдельно от лектинов, поскольку СВМ обнаруживаются в основном в составе полисахарид-деградирующих ферментов и их функцию связывают с повышением

Сокращения: LecP — растворимые лектиновые белки (от англ. lectin protein), LecRLP — лектиновый рецептор-подобный белок (от англ. lectin receptor-like protein), LecRLK — лектиновая рецептор-подобная киназа (от англ. lectin receptor-like kinase), CrRLK1L — белки, подобные рецептор-подобной киназе *Cathartus roseus* 1.

эффективности ферментативной реакции при взаимодействии белка с субстратом [6]. Именно поэтому СВМ-белки включены в базу данных CAZY (Carbohydrate-Active enZYmes), тогда как лектины в ней отсутствуют. Хотя на сегодняшний день известны белки с СВМ без ферментативной активности, и наоборот — белки, включающие, наряду с лектиновыми, домены с каталитической функцией, эти два класса белков пока рассматриваются отдельно.

Данный обзор обобщает современные представления о растительных белках с лектиновыми доменами, их разнообразии и функциях. Лексика в области лектинологии растений не устоялась и продолжает пополняться и развиваться, поэтому названия лектинов в обзоре приведены как на кириллице, так и на латинице, сокращенные названия — только на латинице.

1. МНОГООБРАЗИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЛЕКТИНОВ

Лектины в мире растений представлены широко и разнообразно. Это касается как распространения внутри растительного царства (лектины обнаружены у всех видов растений), так и распределения внутри отдельно взятого растения (как на организменном, так и на клеточном уровне). Лектины выявлены во всех органах растений — в корнях, побегах, листьях, цветках, плодах и семенах [7, 8]. В большом количестве лектины присутствуют в запасующих тканях (семенах, луковицах, корневищах) некоторых видов растений, иногда обнаруживаются в заметных количествах в проводящих тканях (ксилеме и флоэме). На клеточном уровне лектины обнаружены в клеточной стенке (в том числе заякоренными на плазматической мембране), в ЭПР, в аппарате Гольджи, в хлоропластах, в ядре, в цитоплазме, и, конечно, в вакуоли. Доля вакуолярных лектинов в клетках запасующих тканей довольно значительна относительно других групп вакуолярных белков [9, 10]. В отличие от вакуолярных, ядерные, цитоплазматические и клеточностеночные лектины обычно присутствуют в небольших количествах. Большое разнообразие этих групп лектинов было выявлено при анализе расшифрованных геномов растений.

Помимо разнообразия в распределении по организму, нужно отметить и структурное разнообразие лектинов, которое обусловлено их фундаментальным свойством — распознавать углеводы. Структурное многообразие углеводов растений накладывает отпечаток на особенности доменной организации растительных лектинов, которая существенно отличается от доменной структуры лектинов животных. Показано, что не все лектины, обнаруженные при секвенировании геномов растений, проявляют

способность к агглютинации эритроцитов, которая долгие годы рассматривалась как диагностическая, а термин “агглютинин” служил синонимом к слову “лектин” [8]. В настоящее время для отнесения белка к лектинам и их классификации используются другие принципы.

1.1. Классификация лектинов на основе аминокислотной последовательности

Все лектины ранее классифицировали на пять групп в зависимости от моносахарида, к которому они проявляют наибольшее сродство: манноза, галактоза/N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, фукоза и N-ацетилнейраминаовая кислота [11, 12]. Уже из названий обозначенных лигандов очевидно, что лектины к тому времени исследовались, в основном, в связи с гликозилированными белками клеток животных или фрагментами бактериальных полимеров, а не с полисахаридами клеточных стенок растений.

После анализа геномных данных классификация лектинов, исходно построенная на углеводной специфичности, была пересмотрена. Основой для современной классификации служит сходство с аминокислотной последовательностью лектина, для которого экспериментально продемонстрирована способность связываться с углеводами. При этом в большинстве случаев используют вычисленную аминокислотную последовательность, определенную с помощью биоинформатических подходов по нуклеотидной последовательности соответствующего участка генома. На основе такого подхода в лектинологии растений в настоящее время выделяют 16 семейств белков с лектиновыми доменами, которые часто получают название как производные от латинского названия вида, где их представители были впервые охарактеризованы: Legume (впервые описаны у Leguminosae), GNA (агглютинин *Galanthus nivalis*), Nictaba (агглютинин *Nicotiana tabacum*), жакалины (лектин джекфрута (jackfruit)), амарантины, кальретикулины (кальций-зависимые лектины эндоплазматического ретикулума), галактозо-связывающие лектины, галектин-подобные лектины, лектины с LysM доменами (мотив лизина), гевеины (белок латекса *Hevea brasiliensis*), CRA (chitinase-related agglutinin — агглютинин, родственник хитиназам класса V), лектины С-типа (CLEC, кальций-зависимые лектины), EUL (агглютинин *Euonymus europaeus*), рицин В, АВА (агглютинин *Agaricus bisporus*), циановирины [13, 14]. В общую классификацию не входят, но ряд исследователей к лектинам причисляет группу белков с малектиновыми (лектины, связывающие мальтозу) и малектин-подобными доменами (PF11721, PF12819) [4, 15]. Малектин-подобный домен фактически включает два малектиновых

домена в тандеме [16]. Малектиновый домен с идентификатором PF11721 включен в базу углеводов-активных ферментов CAZy с идентификатором CBM57, поскольку у бактерий этот домен связан с различным гликозидазным доменом (GH2, GH16) [16], при этом большинство лектиновых доменов в базе CAZy отсутствуют, так как по определению они не обладают ферментативной активностью. Однако в растениях малектиновый и малектин-подобный домены (PF12819) в белках присутствуют в комбинации с неактивными в отношении углеводов доменами: с киназным доменом или с LRR-доменами (лейцин-богатые повторы) [15]. Некоторая историческая запутанность в отнесении или неотнесении белков к лектинам, особенно между исследователями, занимающимися разными группами организмов, очевидна также для галактозо-связывающих и галектин-подобных лектинов. В клетках животных галектины в основном представлены как “чистые” лектины и служат важным компонентом внеклеточного матрикса, а у растений аналогичный домен входит в состав более сложных белков,

где другие домены обладают ферментативной активностью. При дальнейшем изложении мы, в соответствии с современным определением [4], рассматриваем 18 семейств растительных белков с лектиновыми доменами, включая малектин и малектин-подобные белки (табл. 1).

1.2. Представленность лектинов в растительных геномах и некоторые аспекты эволюции растительных лектинов

Опираясь на данные расшифрованных геномов растений, было выяснено, что распределение лектиновых мотивов внутри растительного царства вариабельно. В геномах цветковых растений в результате биоинформатического скрининга выявляется, как правило, около трех-четырех сотен генов, кодирующих лектины [2, 17–19]. Доля генов лектинов среди всех белок-кодирующих генов обычно составляет около 1%. Наиболее представленными семействами при этом являются семейства GNA, Legume и малектин-подобных белков (рис. 1). Такая закономерность характерна для всех групп семенных

Таблица 1. Доля белков с киназными доменами среди лектинов 16 различных семейств у льна и кукурузы (лектины ABA и циановирины у приведенных видов растений отсутствуют) [18, 19]

Семейство	Идентификатор в базах данных	<i>Zea mays</i> кол-во киназ/общее кол-во генов	<i>Linum usitatissimum</i> кол-во киназ/общее кол-во генов
GNA	PF01453	68/81 (83%)	96/109 (88%)
Legume	PF00139	46/51 (90%)	65/72 (90%)
Малектин-подобные	PF12819	22/32 (69%)	36/46 (78%)
LysM	PF01476	10/29 (34%)	16/36 (44%)
Жакалины	PF01419	3/20 (15%)	0/4
Nictaba	PF14299	0/18	0/38
Галектин-подобные	PF00337	0/17	0/11
Галактозо-связывающие	PF02140	0/13	0/24
Кальретикулины	PF00262	0/11	0/8
Гевеины	PF00187	0/10	0/17
Малектины	PF11721	6/9 (67%)	10/14 (71%)
Амарантины	PF07468	0/4	0/19
Рицин В	PF00652	0/3	0/1
EUL	PF14200/PTHR31257	0/2	0/1
С-тип	PF00059	1/1 (100%)	2/2 (100%)
CRA	—	0/0	0/4
Итого:		156/301 (52%)	225/406 (55%)

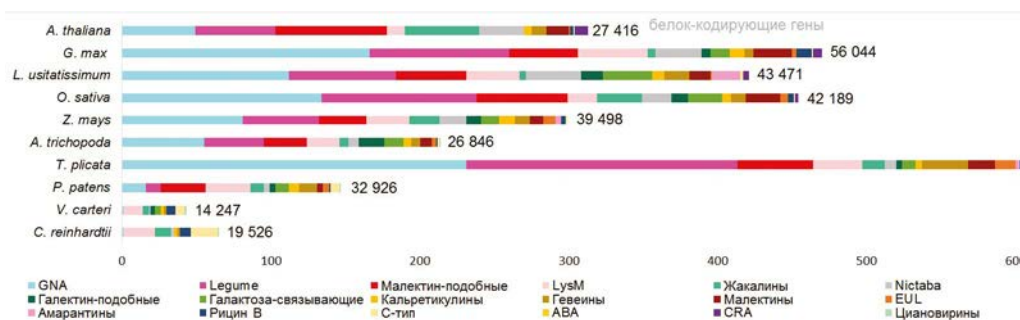


Рис. 1. Распределение семейств лектинов в геноме растений: резуховидки Таля (*Arabidopsis thaliana*) [14, 17, 20], сои (*Glycine max*) [2, 14, 21], льна (*Linum usitatissimum*) [18], риса (*Oryza sativa*) [2, 14, 22], кукурузы (*Zea mays*) [19], амбореллы (*Amborella trichopoda*), туи (*Thuja plicata**), фискомитреллы (*Physcomitrium patens*) [23], вольвокса (*Volvox carteri**), хламидомонады (*Chlamydomonas reinhardtii**). Различные семейства лектинов обозначены разными цветами, сбоку справа представлено общее количество белок-кодирующих генов в геноме соответствующего растения (согласно Phytozome). * — поиск по PFAM в базе данных Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>, доступ 25.07.2023).

растений. В эволюционно более ранних таксонах как общее количество генов, кодирующих лектины, так и их распределение по семействам существенно отличается [23].

Некоторые семейства лектинов у растений распространены особенно неравномерно, в частности такие группы как амарантины, жакалины и EUL. Так, гены семейства амарантинов не обнаруживаются в геноме некоторых растений (например, у резуховидки, риса и сои), а у других видов количество генов в семействе может варьировать от однозначных до двузначных чисел (например, 4 гена у кукурузы и 19 у льна). Гены лектинов семейства EUL обнаруживаются в единичных количествах в геномах двудольных растений, однако у однодольных и более низкоорганизованных растений (в частности, у мхов) это количество может достигать десяти и более [24]. Похожая ситуация характерна для семейства жакалинов, количество генов в котором может сильно варьировать у разных видов растений. Например, 50 генов белков с жакалин-подобными доменами идентифицировано у резуховидки, 30 у риса, 20 у кукурузы и всего 4 гена у льна; при этом на филогенетическом древе лектины семейства жакалинов различных видов растений разделяются между собой [18, 19].

Эволюционная история разных семейств лектинов растений развивалась по-разному. Для лектиновых доменов Legume, GNA, LysM, рицина В, жакалинов и малектинов предполагается наличие у последнего общего предка бактерий и архей, тогда как лектины АВА и циановирины ведут свое происхождение из царства грибов, где они имеют наибольшее распространение. Обнаружение тех же циановиринов у некоторых бактерий и эукариот, кроме грибов, связывает с горизонтальным переносом генов [3].

Лектиновые домены гебекинов и Nictaba развились у эукариотических организмов, при этом домен гебекинов обнаруживается во всех группах

эукариот и, по-видимому, присутствовал в геноме их последнего общего предка. В свою очередь, домен Nictaba обнаружен у грибов, но наиболее широкое распространение получил у растений, а гомологичные гены в геномах других организмов, вероятнее всего, были потеряны в ходе эволюции [3].

Три семейства лектинов уникальны для растений: семейство EUL (предположительно, возникло впервые у мохообразных), семейство амарантинов (развилось у плаунов), и малектин-подобные белки (обнаруживаются у всех растений) [2].

1.3. Особенности доменной организации

При анализе геномов растений выявляются особенности доменной организации растительных лектинов, которые определяют особенности функционирования этих белков в растительных клетках и тканях. Представители одного и того же белкового семейства могут иметь резко отличающуюся доменную организацию (рис. 2а). Среди лектиновых белков редко встречается архитектура, обозначаемая как меролектин, которая включает только единственный лектиновый домен. Чаще два или более гомологичных, или идентичных лектиновых домена расположены тандемно. Такие лектины обозначают как хололектины. Среди хололектинов выделяют особый класс суперлектинов, которые имеют два или более углевод-связывающих домена, специфичных в отношении структурно различных углеводов [26, 27]. Для обозначения архитектуры белка в том случае, когда домен лектина связан с неродственным доменом (например, киназным или гликозидгидролазным), введено понятие химеролектин. Именно химеролектины обнаружены в большом количестве при секвенировании растительных геномов.

В зависимости от наличия трансмембранного домена, который часто встречается у лектинов

растений, и его сочетания с другими доменами, в частности киназным как наиболее представленным, различают три типа архитектуры лектинов, которые встречаются у представителей разных семейств (рис. 2б). Первый тип — не связанный с мембраной белок, с сигнальным пептидом или без него и лектиновым доменом (доменами), который может быть дополнен другими нелектиновыми доменами; такие растворимые лектиновые белки обозначаются LecP. Химеролектин, по структуре аналогичный первому типу, но заякоренный в мембране с помощью трансмембранного домена, составляет второй тип и называется лектиновый рецептор-подобный белок (LecRLP). Наконец, третий тип архитектуры — лектиновая рецептор-подобная киназа (LecRLK), включающая в качестве обязательных компонентов не только сигнальный пептид с N-конца, далее лектиновый и трансмембранный домены, но и цитоплазматический киназный домен, который всегда расположен с C-конца белка. Среди известных последовательностей растительных лектинов более половины приходится на архитектуру рецептор-подобной киназы (табл. 1); преобладание такой доменной организации специфично для растительного царства [15].

Киназные домены описаны в последовательностях лектиновых белков из семи различных семейств (рис. 2в), в том числе у 70–90% представителей наиболее обширных семейств —

GNA, Legume и малектин-подобных белков (табл. 1). В одном и том же семействе лектиновых белков структура LecRLK может варьировать за счет различного количества tandemно расположенных лектиновых доменов, или наличия/отсутствия дополнительных характерных элементов, таких как LRR, PAN/Apple и т. д. (рис. 2в). Таким образом, для лектиновых белков растений характерно модульное строение с различными комбинациями отдельных доменов и различной их локализацией в общей структуре молекулы.

При анализе геномов выявлено, что комбинации доменов имеют свою специфику распределения. Например, белковые структуры, включающие домены GH и гевеина или рицина, повсеместно распространены у зеленых растений (Viridiplantae), в то время как комбинация домена GH и домена GNA или LysM ограничена мохообразными (Bryophyta). Для комбинации доменов GH и гевеина специфика присутствует и в порядке расположения доменов, и типе гликозидгидролазного домена (рис. 3в). Последовательности гевеин-GH специфичны для высших растений (Embryophyta), а последовательность GH-гевеин встречается только у зеленых водорослей (Chlorophyta). При этом только у мохообразных встречается GH домен 18 семейства, в то время как у остальных высших растений с доменом гевеина скомбинирован GH домен 19 семейства [3]. Оба этих семей-

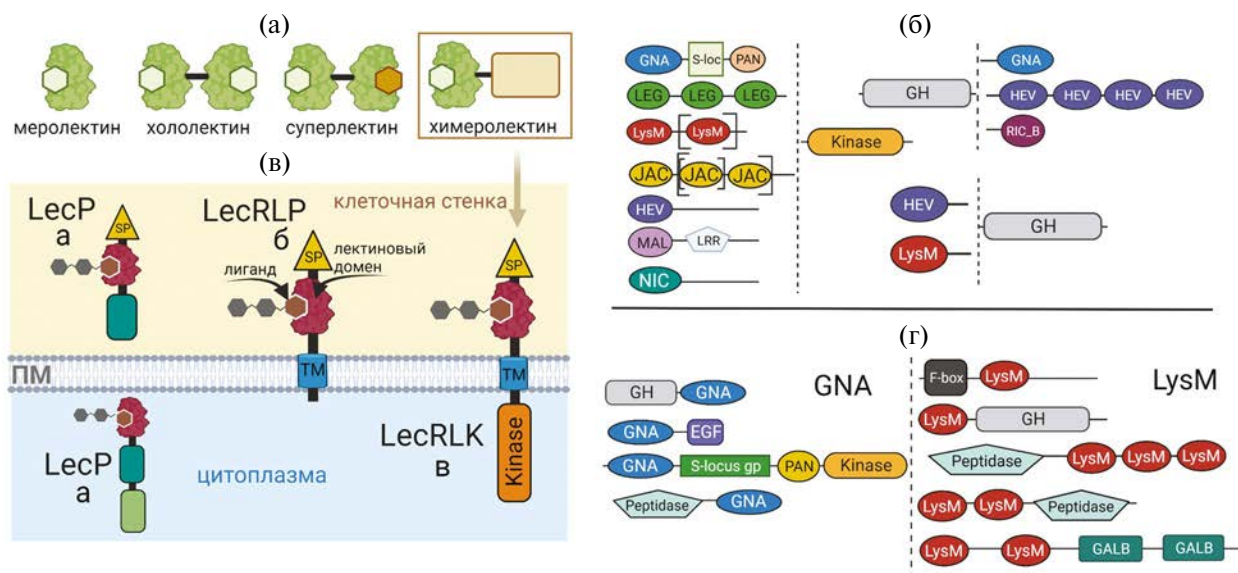


Рис. 2. Доменная организации и общая архитектура лектинов. (а) — Типы лектинов: меро-, холо-, супер-, и химеролектины. (б) — Варианты архитектуры химеролектинов и их обозначения: а — растворимые белки без трансмембранного домена LecP, б — заякоренные в мембране без киназного домена LecRLP, в — трансмембранные белки с киназным доменом LecRLK (по [15] с модификациями). (в) — Варианты доменной организации лектиновых белков с различным сочетанием лектиновых и киназных доменов, а также лектиновых и гликозидгидролазных (GH). Киназный домен всегда расположен с C-конца белка. (г) — Примеры сочетаний разных доменов для лектиновых белков из семейств GNA и LysM [3, 25]. ТМ — трансмембранный домен, SP — сигнальный пептид, ПМ — плазмалемма. Рисунок создан с помощью biorender (<https://www.biorender.com/>).

ства гликозидгидролаз включают ферменты с хитиназной активностью, а 18 семейство еще и эндо- β -ацетилглюкозаминидазы, осуществляющие гидролиз N,N'-диацетилхитобиозильного звена в высокомолекулярных гликопептидах и гликопротеинах [3].

2. ЛИГАНДЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЛЕКТИНОВ

2.1. Виды лигандов растительных лектинов

Ключом к пониманию биологической роли лектинов в растительном организме являются лиганды, которые распознаются углевод-связывающими доменами белковой молекулы. Лектины взаимодействуют с углеводами самой разнообразной структуры — от простых моно- и олигосахаридов до сложных разветвленных полисахаридов. Углеводные модификации гликозилированных белков, липополисахаридов и гликолипидов также являются лигандами углевод-связывающих доменов лектинов [4].

Углеводы являются наиболее распространенным типом биомолекул в природе. Они используются в качестве строительных блоков компонентов клеточных стенок, в качестве биохимического топлива в энергетическом обмене, удовлетворяя как краткосрочные, так и долгосрочные энергетические потребности в виде свободных и запасенных метаболитов. В виде структурных компонентов входят в состав сложных полимеров: нуклеиновых кислот (например, рибоза и дезоксирибоза), липополисахаридов, гликозаминогликанов и полисахаридов. Процессы гликозилирования белков и липидов оказывают влияние на их структуру, укладку, локализацию и функцию [28]. Структурная информация, кодируемая углеводами, часто воспринимается клеткой через взаимодействие лектин-углевод.

Лектины растений могут также взаимодействовать с гидрофобными лигандами (например, порфиринами, фитогормонами). Возможности таких взаимодействий показаны *in vitro* и рассчитаны в компьютерных моделях, прямых свидетельств взаимодействия с фитогормонами *in vivo* не зарегистрировано [4, 29]. Среди лигандов лектинов описан экстраклеточный АТФ. В семействе Legume у *A. thaliana* два представителя охарактеризованы как первые пуриnergические рецепторы растений [30, 31]. Это рецепторные киназы LecRK-I.9 (известная также как DORN1 (DOES NOT RESPOND TO NUCLEOTIDES1)) и LecRK-I.5, для которых вводится новое обозначение, по аналогии с номенклатурой пуринорецепторов животных — P2K1 и P2K2. Еще один представитель этого семейства — киназа LecRK-I.8, расположенная на филогенетическом древе в одной кладе с вышеупомянутыми киназами, является сенсором экстраклеточного НАД⁺ [30, 32, 33].

2.2. Принципы распознавания лигандов

К настоящему времени накоплены данные о молекулярной организации и структуре для ряда лектиновых доменов растений, охарактеризованы консервативные аминокислотные остатки в сайтах связывания углеводов, имеются данные рентгеноструктурного анализа, в некоторых случаях получены данные для лектинов, сокристаллизованных с их лигандами [34–36]. Связывающие сайты лектинов содержат полярные остатки, которые образуют водородные связи с многочисленными гидроксильными группами углеводов, возникающие при этом обширные сети из водородных связей, играют ключевую роль в специфике лиганда. Во взаимодействии с лигандом участвуют также ароматические боковые цепи остатков триптофана и тирозина, ионы кальция или магния [6, 15].

Эти механизмы используются в лектинах различных семейств для связывания моносахаридного остова в первичном сайте связывания, но высокая селективность и разнообразие достигаются за счет дополнительных и вторичных сайтов связывания, которые усиливают контакты с олигосахаридами или гликоконъюгатами. Дополнительные сайты связывания часто уникальны для отдельных членов семейств [37].

Сильное сродство (в микромолярном-наномолярном диапазоне) лектиновых доменов с лигандом часто реализуется через мультивалентные взаимодействия. Кластеризованные углевод-связывающие сайты могут возникать благодаря наличию двух или более лектиновых доменов в одном белке, либо в ходе олигомеризации одновалентных белков [6]. Для лектинов многократно описаны варианты ди- и тетрамеризации, что повышает специфичность связывания и ее варибельность [37, 38].

3. РЕАЛИЗАЦИЯ ФУНКЦИЙ ЛЕКТИНОВ В РАЗЛИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КОМПАРТМЕНТАХ

Пятнадцать-двадцать лет назад исследования роли лектинов в растительном организме, которые широко были представлены и в нашей стране, были сосредоточены на единичных, в основном водорастворимых, лектинах. В качестве основных инструментов использовалась реакция агглютинации и (в редких случаях) иммунохимические подходы, а содержание отдельных лектинов сопрягалось с воздействием определенных факторов различной природы [39–41]. Основные идеи о функциях лектинов в растениях, разработанные в то время, можно суммировать следующим образом: 1) лектины нужны для узнавания патогенов и борьбы с ними; 2) некоторые лектины относятся к запасным белкам, поскольку накапливаются в значительных коли-

чествах (в основном в семенах); 3) при различных воздействиях может происходить изменение содержания изучаемых лектинов.

Омиксные технологии выявили сотни белков с лектиновыми доменами, относящиеся к десяткам семейств [2, 15]. Богатую пищу для размышлений о функциях лектинов дают полногеномные исследования транскриптомов для физиологически отличающихся образцов растительных тканей [18, 19]. На основании множества типов строения лектинов и различного характера их дифференциальной экспрессии можно сразу предполагать многочисленность функций, что дополнительно подкрепляется разнообразием и спецификой локализации белков с лектиновыми доменами в растении (рис. 3). Так, например, было сделано предположение, что паттерны экспрессии генов белков с лектиновыми доменами в тканях стебля льна связаны с отложением различных типов клеточных стенок [18]. Мы будем рассматривать накопленные данные о механизмах функционирования углевод-связывающих белков в привязке к различным компартментам растительной клетки.

3.1. Разнообразие и функции лектинов, локализованных в вакуоли

Внутри клетки лектины представлены в различных органах и в многочисленных компарт-

ментах растительной клетки (рис. 3). В количественном отношении больше всего лектинов обнаруживается в семенах и запасаящих тканях (луковица, кора, корневище) [7, 8, 13]. Эти белки локализованы в виде белковых тел в запасящей вакуоли, где они могут выступать в роли внутриклеточных запасов азота для молодого растения, либо выполнять защитные функции, являясь непосредственно токсичными для патогенов [44, 45]. По причине высокого содержания именно такие лектины были впервые обнаружены и охарактеризованы у растений. Самыми известными примерами таких лектинов являются рицин из клещевины (*Ricinus communis*), фитогемагглютинин из фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*) и агглютинин из подснежника (*Galanthus nivalis*) – представители семейств рицин В, Legume и GNA соответственно [10]. Эти вакуолярные лектины реализуют защитную функцию, действуя в желудочно-кишечном тракте насекомых, где они могут связываться с гликопротеинами эпителиальных клеток [8].

В вакуоли в специальных белковых образованиях (лютоидах) локализован белок гевеин, давший название соответствующему лектиновому домену, который связывает хитин мембран различных патогенов [46]. Защитная функция вакуолярных лектинов, принадлежащих семейству гевеинов, реализуется через ингибирование

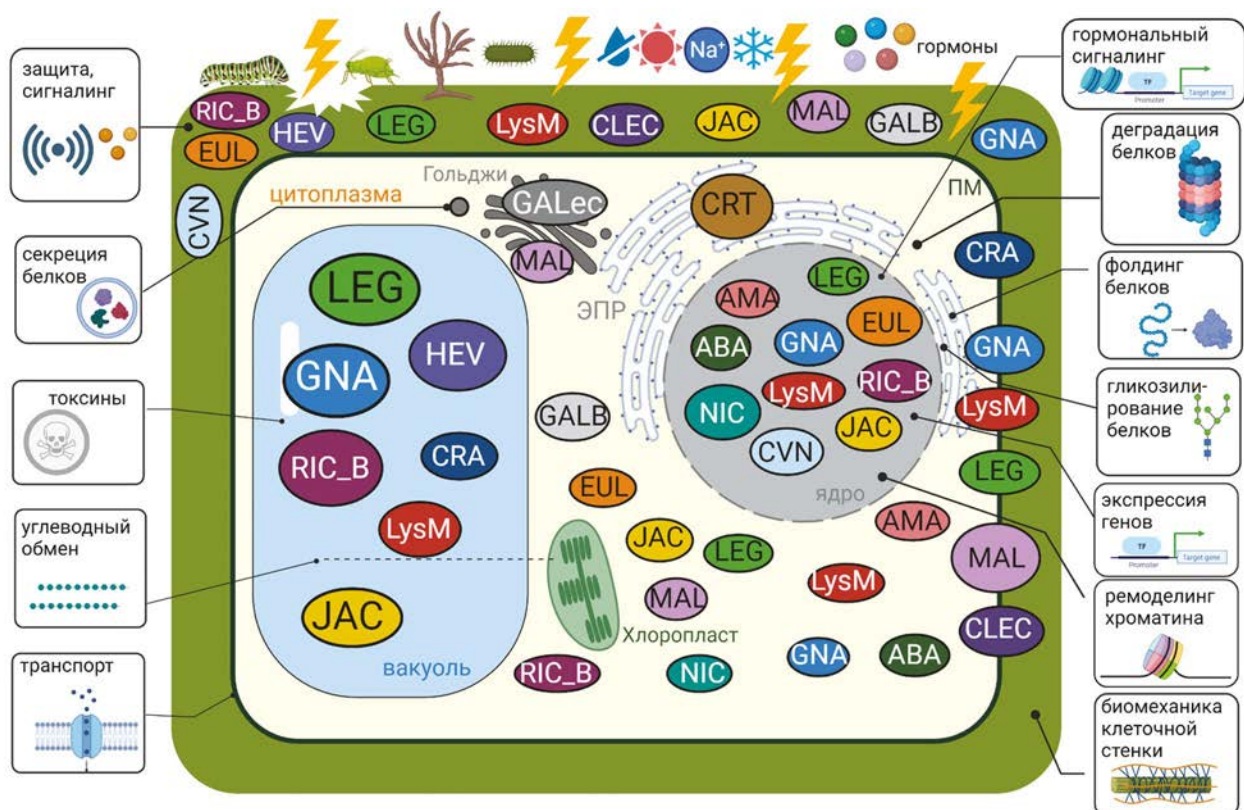


Рис. 3. Субклеточная локализация растительных лектинов [4, 18, 42, 43]. Рисунок создан с помощью biorender (<https://www.biorender.com/>).

роста патогенных грибов при прорастании семян [47]. Другие известные белки семейства геветинов — агглютинин зародышей пшеницы (WGA) и агглютинин крапивы *Urtica dioica* (UDA). Геветины, помимо углевод-связывающего домена, часто имеют С-концевой каталитический домен хитиназы. Антифунгицидные свойства хитиназ обеспечиваются непосредственно каталитическим доменом, однако присутствие лектинового домена приводит к усилению этого эффекта, предположительно, за счет увеличения аффинности белка к субстрату [48]. Согласно наблюдениям, добавление геветина и UDA к грибковой среде приводит к образованию толстых гиф, а не к их лизису, как при воздействии хитиназ без лектинового домена. Брокарт с соавт. предположили, что эти небольшие хитин-связывающие белки образуют поперечные связи с хитином, предотвращая рост клеток на кончиках растущих гиф [49]. Это связывание может замедлить рост гиф, действуя как первая линия интегрированной системы защиты растений.

Описано также участие вакуолярных лектинов (представителей семейств Legume и GNA) в процессах регуляции концентрации свободных сахаров, образующихся в ходе фотосинтетического цикла восстановления углерода и транспортируемых из хлоропластов в вакуоли клетки, где происходит обратимое связывание углеводов с лектинами и придание им осмотической инертности [9, 50]. В то же время обратимые взаимодействия лектин-углевод позволяют поддерживать достаточно стабильный уровень углеводов для немедленных энергетических потребностей [9].

В вакуоли обнаруживаются галактозосвязывающие представители семейства жакалинов [51]. По данным биоинформатического анализа последовательностей лектинов предсказана локализация в вакуоли и некоторых представителей семейств LysM и CRA [3].

3.2. Разнообразие и функции лектинов, локализованных в ядре и цитоплазме

В гораздо меньших количествах, в сравнении с вакуолярными, в клетке содержатся лектины, преимущественно локализованные в ядре и цитоплазме. Есть ряд лектиновых семейств, представители которых имеют только ядерно-цитоплазматическую локализацию — ABA, EUL, Nictaba, амарантины, циановирины (рис. 3). При этом, в этих компартментах могут присутствовать и представители некоторых других семейств лектиновых белков, имеющих более широкий набор мест локализации, например, GNA, Legume, жакарины (рис. 3).

Вероятные механизмы реализации функций лектинов в ядерно-цитоплазматическом компартменте связаны с их участием в процессах

транспорта РНК и белков в ядро и функционированием нуклеопор, а также модификацией гистонов нуклеосом. Связь с функционированием нуклеопор предполагается по аналогии с клетками животных и для растений пока не подтверждена. В частности, показано, что импорт белков в ядро клеток животных ингибируется агглютинином зародышей пшеницы (WGA), способным связываться с гликопротеинами ядерных пор, взаимодействуя с *O*-GlcNAc остатками [52]. Второе предположение основано на том, что единичные остатки *N*-ацетилглюкозамина (GlcNAc), соединенные *O*-гликозидной связью с остатками серина или треонина — распространенная гликомодификация ядерно-цитоплазматических белков. Она характерна, в частности, для ряда коровых гистонов, причем уровень их *O*-гликозилирования зависит от фазы клеточного цикла [53]. Показано, что гистоны H2A, H2B и H4 являются мишенями ряда лектинов группы Nictaba, и это взаимодействие зависит от наличия *O*-GlcNAc [54]. Исследование трех нехимерных гомологов Nictaba *A. thaliana* (обозначенных как AN3, AN4 и AN5) показало, что AN4 и AN5 локализуются в ядре и цитоплазме, тогда как AN3 — только в цитоплазме [55]. Связывание Nictaba с *O*-GlcNAc-модифицированными гистонами в ядре было подтверждено *in vivo* [53]. Эти данные позволяют предположить, что Nictaba действует как модулятор экспрессии генов, используя ремоделирование хроматина.

Для особой группы белков внутри семейства Nictaba, а именно для флоэмных белков PP2, было предположено взаимодействие с различными молекулами РНК, в частности с высокоструктурированными вирионными РНК [56]. Белки PP2 (phloem protein) известны еще с 70-х годов прошлого века, обнаружены при протеомных анализах флоэмного сока представителей семейства Cucurbitaceae и позднее были охарактеризованы на уровне cDNA [57]. Эти хитин-связывающие белки являются структурными белками проводящих элементов высших растений. После идентификации в листьях табака индуцируемого стрессом лектина, названного Nictaba, стало понятно, что в домене PP2 помимо углевод-связывающего Nictaba-домена присутствует дополнительная N-концевая последовательность (приблизительно из 65 аминокислотных остатков) и короткая С-концевая последовательность, содержащая два цистеиновых остатка, важных для образования межмолекулярной дисульфидной связи между лектинами PP2 и флоэмными белками нелектиновой природы PP1. Дисульфидная связь формируется при повреждении флоэмы и контакте структурных белков с воздухом и, как следствие, образуется структура наподобие жесткого геля, что, по-видимому, предотвращает инфицирование поврежденной ткани микроорганизмами [58].

Некоторые белки с доменом Nictaba могут взаимодействовать и с высокоманнозными и сложными *N*-гликанами. С использованием генетической конструкции, в которой ген, кодирующий такой белок, был сшит с последовательностью, кодирующей зеленый флуоресцентный белок (GFP), показано, что расположение меченого белка Nictaba в ядре растительной клетки со временем меняется [59]. Через двадцать четыре часа после трансформации клеток ВУ-2 меченый Nictaba гомогенно экспрессировался в ядрах растительных клеток. В дальнейшем лектин накапливался на ядерной оболочке.

С фазой клеточного цикла связана реализация функций другой группы лектиновых белков с ядерной локализацией — специфичных для растений кинезинов, имеющих малектиновый домен [60]. Их экспрессия повышена в тканях с высокой долей интенсивно делящихся клеток и, вероятно, они, как и другие моторные белки, вовлечены в процессы клеточного деления. Внутриклеточная локализация кинезинов с малектиновым доменом меняется в зависимости от клеточного цикла: в метафазе их локализация связана с тубулином веретена деления, а на более поздних стадиях они обнаруживаются в средней зоне фрагмопласта, в интерфазе же белки локализованы в ядре, либо удаляются из клеток, как это было показано для клеток семенной оболочки [60].

Предполагается также участие лектинов в таком сложном регуляторном механизме как убиквитинирование, поскольку некоторые лектиновые домены (в частности, Nictaba, LysM и жакалин) в растительных геномах представлены в комбинации с белковыми доменами F-box — характерным мотивом для взаимодействия с белком Skp1, который входит в комплекс, обеспечивающий присоединение убиквитина для дальнейшего направления в протеасомы [2, 61]. Убиквитинирование белков у растений, помимо селективной деградации белков, регулирует также целый ряд клеточных процессов, включая модуляцию белок-белковых взаимодействий, морфогенез, восприятие гормонов и сигналинг, клеточный цикл, ответы на абиотический стресс и взаимодействие растений с патогенами [62]. Белок с F-box доменом определяет субстратную специфичность комплекса, осуществляющего убиквитинирование. Как правило, консервативный F-box домен расположен с N-конца белковой молекулы, а C-концевой домен является варибельным и отвечает за связывание с белком-мишенью. Для F-box белка семейства Nictaba у *A. thaliana* (At2g02360) экспериментально продемонстрирована возможность распознавания и *N*-, и *O*-гликанов, свидетельствуя, что в неродственных олигосахаридных мотивах могут находиться эпитопы, узнаваемые одним и тем же

лектиновым доменом [61]. Для ряда других представителей группы лектинов Nictaba с F-box доменом у *A. thaliana* продемонстрировано взаимодействие с белками ASK (Arabidopsis-SKP1-like), еще одним компонентом комплекса убиквитинирования. Все это дает основания предположить, что, по крайней мере, некоторые лектины с F-box доменами могут играть важную роль в гомеостазе гликопротеинов, воспринимая неправильную укладку гликопротеинов и участвуя в убиквитин-протеасомной системе деградации.

Концентрация ядерно-цитоплазматических лектиновых белков внутри клетки часто возрастает при воздействии стрессовых факторов различной природы [51, 63]. Эти лектины называют “индуцибельными”. Была разработана концепция, согласно которой лектин-опосредованные белок-углеводные взаимодействия в цитоплазме и ядре играют важную роль в физиологии стресса растительной клетки [13, 63]. Следует, однако, отметить, что во всех случаях концентрации цитоплазматических лектинов в тканях растений остаются низкими. Поэтому было высказано предположение, что эти лектины участвуют в сигнальных реакциях в растительных клетках/тканях или между растениями и другими организмами [10, 13, 51, 63]. Предполагается, что эти процессы тесно связаны с интенсификацией *N*-гликозилирования белков при стрессе, поскольку многие защитные белки являются *N*-гликозилированными [51, 64]. Анализ углевод-белковых взаимодействий демонстрирует, что большинство растительных лектинов предпочтительнее взаимодействует со сложными высокоманнозными *N*-гликанами (углеводные модификации гликозилированных белков), чем с молекулами простых сахаров [65]. Предполагается, что это справедливо и для ядерно-цитоплазматических лектинов, хотя данных об их углеводной специфичности накоплено сравнительно немного [51]. Представлены аргументы в пользу того, что Nictaba может взаимодействовать с *N*-гликозилированными белками: связывание лектина с ядерными белками почти полностью отсутствует после обработки образцов ферментом PNGазой F, осуществляющей дегликозилирование [59].

В ответ на абиотические стрессовые стимулы, поранение, инфицирование, повышается экспрессия генов жакалинов [66]. Это семейство разделяют на две группы по углеводной специфичности и субклеточной локализации [13]. Галактозосвязывающие представители локализованы в вакуолях, тогда как маннозосвязывающие — в ядре и цитоплазме [67]. Для некоторых представителей была показана возможность неклассической секреции в апопласт [68]. Галактозосвязывающие жакалины характерны для растений семейства тутовые, тогда как ман-

нозосвязывающие распространены у всех зеленых растений [13]. Жакалин-подобный белок JAX1 *A. thaliana* может обеспечивать устойчивость растения к потекс-вирусам за счет снижения накопления вирусной РНК [69]. Домены жакалина, судя по всему, также могут служить ловушками для молекул-эффекторов патогенов, способствуя устойчивости растения к инфицированию [70]. Для белка Orysata (представитель семейства жакалинов у риса) была показана высокая инсектицидная активность [71]. Для некоторых белков показана возможная роль в процессах роста и развития растений [72]. Жакалин-родственные белки, лектиновый домен которых соединен с диригент-доменом, могут быть вовлечены в процессы биосинтеза лигнина, поскольку белки семейства диригент растений принимают участие в обеспечении регио- и стереоселективности реакций соединения монолигнолов в полимер [73, 74].

К ядерно-цитоплазматическим лектинам относятся и амарантины (рис. 3). Точная функция этих белков неизвестна, предполагается, что они участвуют в стресс-индуцированном сигналинге и способствуют адаптации растений к неблагоприятным условиям [75]. Существенное повышение экспрессии генов амарантинов наблюдали в кончиках корней проростков льна устойчивых к фузариозу сортов при заражении *Fusarium oxysporum* [76].

Агглютинин *Euonymus europaeus* (ЕЕА, семейство EUL), впервые обнаруженный в 1954 г., также входит в группу стресс-индуцибельных белков с лектиновым доменом. Семейство лектинов EUL присутствует у всех наземных растений [24]. Несмотря на высокое сходство в аминокислотной последовательности, для белков этого семейства показана различная углеводная специфичность [77, 78]. Для лектина риса OsEULD1b при помощи двугибридного анализа и BiFC (бимолекулярной флуоресцентной комплементации) показано взаимодействие с ДНК-связывающим белком MNB1B, гистоном 4, S-аденозилметионин синтазой 2 и рядом других стрессовых белков в условиях засухи [79]. Единственный белок семейства EUL, обнаруженный у *A. thaliana*, обозначаемый ArathEULS3, имеет цитоплазматическую и ядерную локализацию при отсутствии стресса, однако способен к неклассической секреции во внеклеточное пространство под воздействием стрессовых факторов [77, 80]. ArathEULS3, судя по всему, необходим для функционирования устьиц [81]. Также высказано предположение, что ArathEULS3 может быть частью более крупного белкового комплекса, включающего богатый глицином РНК-связывающий белок, и таким образом участвовать в регуляции процессов транскрипции [80].

3.3. Функции лектинов, локализованных в ЭПР и аппарате Гольджи

В эндоплазматической системе локализованы особые лектины, имеющие специфическую функцию. Речь идет, в первую очередь, о кальретикулинах, название которых происходит от двух слов: кальций и ретикулум. В эндоплазматическом ретикулуме свободные кальретикулины и мембраносвязанные кальнексины выполняют роль шаперонов и вовлечены в “контроль качества” гликопротеинов. Связывая гликановые структуры новосинтезированных белков, эти лектины предотвращают их неспецифическую агрегацию и способствуют правильному протеканию этапов фолдинга [82]. Данный процесс весьма консервативен у животных и растений, что свидетельствует о его важности для физиологии клетки [83]. В клетках животных роль шаперонов выполняют также малектины, при этом, у растений эти белки чаще имеют иную субклеточную локализацию и не вовлечены в процессы фолдинга. Однако в недавнем исследовании было продемонстрировано связывание малектина риса OsMLD1, локализованного в ЭПР и аппарате Гольджи, с гомологом рибофорина I риса (OsRpn1) — одной из субъединиц комплекса олигосахарилтрансферазы, задействованной в контроле качества гликопротеинов [84].

В аппарате Гольджи локализованы белки с галактозилтрансферазным доменом семейства 31 (GT31), которые у животных участвуют в созревании N-гликанов; среди них есть группа химеролектинов с галектиновыми доменами. У *A. thaliana* (по данным филогенетического анализа семейства GT31) такие химеролектины выделяют в отдельное подсемейство 1. Для одного члена подсемейства, обозначаемого GALT1, экспериментально установлено участие в созревании N-гликанов: он выполняет функцию галактозилтрансферазы и переносит галактозу (Gal) на концевой остаток GlcNAc с формированием β -1,3-связи на начальном этапе формирования эпитопа Льюиса [85]. В структуре белка галектиновый домен расположен между N-концевой областью, ответственной за заякоривание на мембране, и каталитическим доменом. Предполагается, что ни один из других членов подсемейства не участвует в созревании N-гликанов [82]. Недавно было предположено, что члены этого подсемейства, содержащего лектиновые домены, инициируют биосинтез арабиногалактана путем переноса галактозы на гидроксипролина арабиногалактановых белков [86].

3.4. Разнообразие и функции лектинов, локализованных на плазматической мембране и в клеточной стенке

Подавляющее большинство лектинов, локализованных на плазматической мембране и,

соответственно, имеющих доступ к гликанам клеточной стенки, являются рецептор-подобными белками и киназами. Это представители 6 семейств лектинов: Legume, GNA, LysM, C-типа, малектин-подобные и CRA (рис. 3) [10, 87]. Они участвуют в мониторинге состояния клеточной стенки, во взаимодействии с симбионтами и патогенами, являются первым звеном в цепочках сигнальных каскадов, запускаемых биотическими и абиотическими стресс-факторами [10].

Огромное разнообразие углеводных структур, с которыми сталкиваются лектиновые домены рецепторных киназ, определяет преобладание этой архитектуры среди всех лектиновых белков растений: около 50% последовательностей лектиновых белков составляют рецепторные киназы (табл. 1). При этом значительный вклад в такую многочисленность вносят два крупных лектиновых семейства — Legume и GNA, 80–90% которых являются киназами. Эволюционные расширения этих семейств шли за счет механизма тандемной дупликации, что является распространенным явлением у растений и может привести к функциональной дивергенции генов [88]. В описании физиологической роли лектиновых киназ исследования сосредоточены в основном на распознавании ими компонентов патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (ПАМП) и/либо молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением (ДАМП), имеющих углеводные компоненты.

В восприятие *N*-ацетильных групп хитиновых олигосахаридов (компоненты ПАМП), поступающих от патогенов или симбионтов, вовлечены белки с доменом LysM. Рецепторная киназа *A. thaliana* AtCERK1 (chitin elicitor receptor kinase 1) является основным участником сигнального пути рецепции хитина и действует в качестве корецептора [89, 90]. Исследования кристаллической структуры показали, что олигомеры хитина связываются с LysM-доменами димеров AtCERK1 [91] и предполагалось, что AtCERK1 у *A. thaliana* может служить прямым рецептором хитина. Однако позднее было обнаружено, что другая киназа — AtLYK5 — с LysM доменом у *A. thaliana* демонстрирует кратно большее сродство к олигомерам хитина [92]. Кроме того, присутствие этого белка необходимо для образования димеров AtCERK1 и фосфорилирования этой киназы, в то время как киназный домен самой AtLYK5 неактивен, но необходим для взаимодействия между AtCERK1 и AtLYK5. Таким образом, рецепция хитинового сигнала комплексом AtCERK1-AtLYK5 и его передача на внутриклеточные сигнальные каскады митоген-активируемой протеинкиназы (МАПК) реализуется через активность киназного домена AtCERK1 [93]. Структурно родственные хити-

ну пептидогликаны клеточной стенки бактерий распознаются рецепторными белками с LysM доменом — LYM1 и LYM3, которые не имеют киназного домена и для запуска внутриклеточного сигнального каскада защиты от бактериальных инфекций через процессы фосфорилирования вместе с CERK1 образуют рецепторный комплекс [94]. Механизмы восприятия сигнала через лектины семейства LysM у разных видов растений могут различаться. Например, у белка риса OsCERK1 лектиновый домен не взаимодействует специфически с хитином и предполагается, что с олигосахаридами хитина взаимодействует OsCEBiP (гомолог LYM1/3) и образует комплекс с OsCERK1, что способствует развитию иммунных реакций у растения [95].

Роль рецептора олигосахаридов хитина предполагается для киназы с углевод-связывающим доменом семейства CRA — CHRK1. Апопластный домен CHRK1 демонстрирует значительную гомологию аминокислотной последовательности с хитиназой, но не обладает хитиназной активностью, поскольку в активном центре отсутствуют некоторые аминокислотные остатки, задействованные в реализации ферментативной функции хитиназ [87]. Для киназного домена CHRK1 показана возможность автофосфорилирования и экспериментально продемонстрирована локализация этого белка в мембранах растительных клеток. Экспрессия гена *CHRK1* в растениях *N. tabacum* резко возрастает при грибной патогенной атаке и инфицировании вирусом табачной мозаики [87].

Менее изученными в контексте функционирования являются рецептор-подобные киназы с лектиновыми доменами Legume и GNA, но показано их участие в иммунных ответах растений. Рецепторные киназы с Legume-доменом принимают участие во взаимодействии растений с другими организмами (насекомые, бактерии, оомицеты, грибы) и являются компонентами систем защиты [15]. Лектиновая рецепторная киназа, принадлежащая данному семейству, DORN1 (или P2K1), представляет собой первый рецептор внеклеточного АТФ, идентифицированный у растений [30]. При повреждении клеток растения вследствие различных стрессовых ситуаций молекулы АТФ высвобождаются во внеклеточное пространство и служат в качестве компонентов ДАМП, индуцируя далее соответствующие клеточные реакции (например, повышение уровня цитозольного Ca^{2+} , фосфорилирование МАПК и экспрессию генов) [96]. Пока не получено свидетельств того, что специфическое взаимодействие между углеводами и LecRLK Legume-типа реализуется или может участвовать в передаче сигналов ПАМП [4]. Накапливаются сведения, что передача сигналов таких LecRLK может быть опосредована посредством белок-белковых взаимодей-

ствий, например, та же киназа DORN1 участвует в поддержании адгезии клеточной стенки к плазматической мембране посредством белок-белковых взаимодействий с участием трипептидных мотивов Arg-Gly-Asp (RGD) [97].

Рецепторные киназы с GNA-доменом распознают высокоманнозные *N*-гликаны. Именно через маннозу идет связывание компонентов клеточной стенки патогенов лектином перца CaMBL1 (маннозосвязывающий лектин 1 *Capsicum annuum*), что играет роль в развитии реакции гиперчувствительности [98]. Лектиновая рецептор-подобная киназа этого семейства LORE (LIPOOLIGOSACCHARIDE-SPECIFIC REDUCED ELICITATION) у *A. thaliana* активирует иммунный ответ растения через взаимодействие с липополисахаридами бактерий, что индуцирует автофосфорилирование данной рецептор-подобной киназы и дальнейшее фосфорилирование ею цитоплазматических киназ PBL34, PBL35 и PBL36 [99]. Рецепторная киназа с GNA-доменом тополя PtRLK1 – ключевой регулятор колонизации корней растений грибами *Laccaria bicolor* [100]. Другой представитель семейства GNA – SpSRLK-5 томата – является белком устойчивости к *F. oxysporum* [101].

Помимо участия в формировании защитного ответа, некоторые рецепторы с GNA-доменом вовлечены в процессы роста и развития растения. Лектиновый домен присутствует в апопластной части рецепторных киназ S-локуса (SRK), участвующих в развитии реакции самонесовместимости у Brassicaceae. Эти киназы способны распознавать цистеин-богатые белки пыльцы S-локуса (SCR), кодируемые тем же S-гаплотипом, что приводит к ингибированию прорастания пыльцы [102, 103]. Рецепторная киназа *A. thaliana* ARK2 за счет взаимодействия с E3-лигазой 9 (AtPUB9) участвует в регуляции роста боковых корней в условиях фосфатного голодания [104]. Однако в обоих случаях предполагаемые маннозосвязывающие свойства лектинового домена GNA-типа у LecRLK не были подтверждены.

К числу наиболее активно изучаемых в последнее время относятся малектин-подобные белки. Для киназы FERONIA (FER) с малектин-подобным доменом продемонстрирована прямая связь с гомогалактуронаном, компонентом пектиновой составляющей клеточной стенки [105], хотя в целом информации о взаимодействии лектиновых доменов рецепторных киназ с углеводными структурами клеточной стенки самого растения крайне мало. Киназа FER является самой изученной на сегодняшний день из группы CrRLK1L (белков, подобных рецептор-подобной киназе 1 *Catharanthus roseus*). Рецептор-подобные киназы этой группы играют роль сенсоров состояния клеточной стенки рас-

тений. С внеклеточными доменами этих белков способны взаимодействовать короткие пептиды RAPID ALKALINIZATION FACTOR (RALF), что способствует образованию комплекса киназ группы CrRLK1L с белками LRE (LORELEI) и/или LLG (LORELEI-подобные гликозилфосфатидилинозитол-заякоренные белки), что, в свою очередь, приводит к активации RopGEF (ROP guanine nucleotide exchange factor) [106]. Тем самым киназы группы CrRLK1L могут принимать участие в передаче разнообразных сигналов, регулирующих рост клеток, морфогенез растений, размножение, иммунитет, гормональный сигналинг и реакции на стрессовые факторы (рис. 4) [107]. Ряд этапов в этих процессах изучен достаточно подробно. Киназа FER вместе с LLG1 участвует в образовании комплекса паттерн-распознающих рецепторов, индуцируемом ПАМП [108]. В то же время, взаимодействие этого же рецептора с RALF1 и RALF23 подавляет растяжение клеток за счет ингибирования активности H⁺-АТФазы 2 (рис. 4) [106, 111]. Показано участие FER в восприятии механического стресса посредством активации сигнального пути ROP6, в результате чего наблюдается реорганизация кортикальных микротрубочек (рис. 4) [109].

Другой белок группы CrRLK1L – THESEUS 1 (THE1) является рН-зависимым рецептором RALF34, связываясь с которым, он принимает участие в регуляции инициации боковых корней [112]. Показано, что THE1 также является частью системы контроля целостности клеточной стенки в растущих клетках *A. thaliana* и активация этого рецептора наблюдается при нарушениях синтеза целлюлозы и других повреждениях клеточной стенки вследствие абиотического или биотического стресса [113]. Участие в удлинении клеток во время вегетативного роста в роли компонентом одного сигнального пути предполагается для FER, THE1 и еще одной киназы этой группы HERCULES RECEPTOR KINASE 1 (HERK1) [114]. Еще одна киназа группы CrRLK1L (ERULUS) функционирует как негативный регулятор активности пектинметилэстераз и, предположительно, участвует в регуляции состава клеточной стенки в корневых волосках [115].

Детально изучается вклад ряда представителей группы CrRLK1L в процессы репродукции растений. Рецепторы ANXUR 1/2 (ANX1/2) и BUDDHA'S PAPER SEAL 1/2 (BUPS1/2) – образуют гетеромерные комплексы на поверхности клеток пыльцевых трубок *A. thaliana*, которые способны воспринимать сигнальные пептиды RALF4/19, вырабатываемые собственными клетками пыльцевой трубки [116]. Это приводит к активации ROP2-RBOHH/J пути образования активных форм кислорода (АФК) и поддержанию целостности клеточной стенки

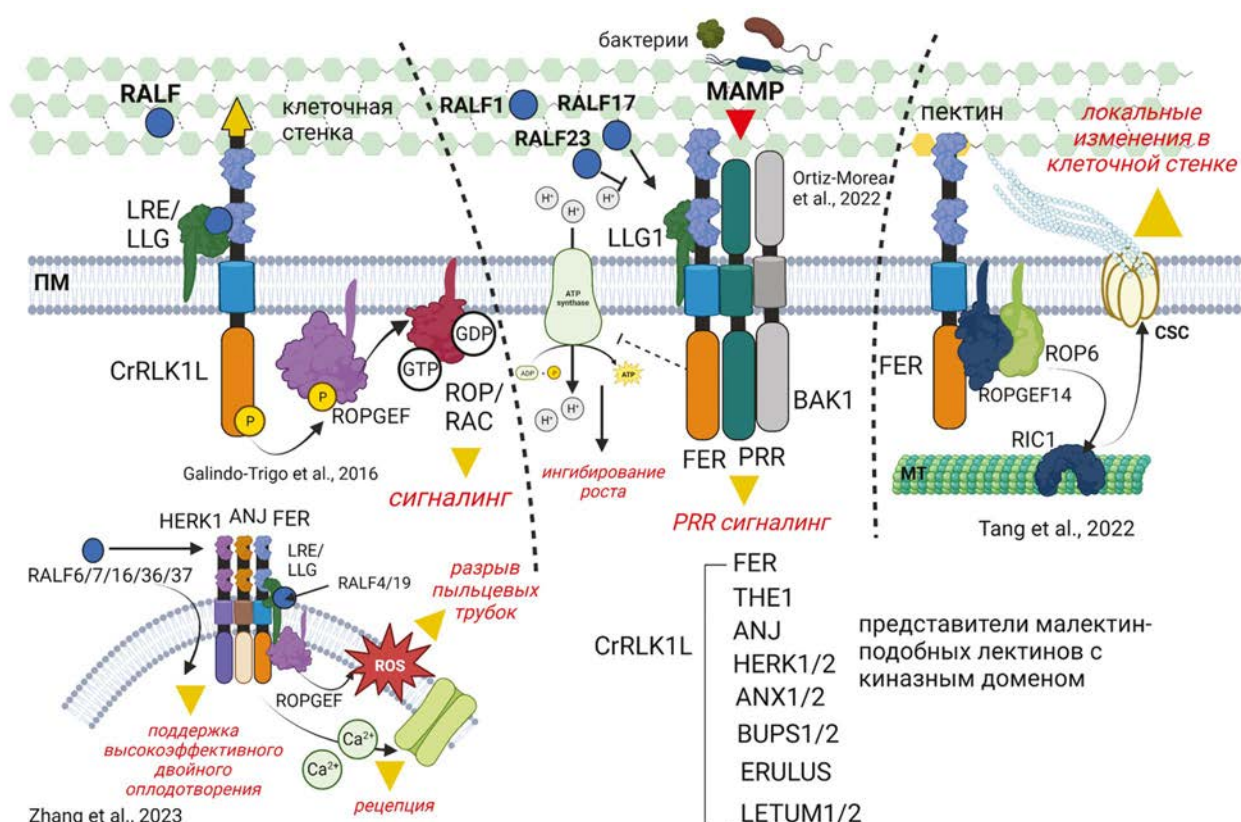


Рис. 4. Ряд функций, описанных для CrRLK1L. Пояснения даны в тексте. Рисунок создан на основе [60, 108–110] с модификациями с помощью biorender (<https://www.biorender.com/>).

во время удлинения клеток [117]. В то же время, вырабатываемый яйцеклеткой сигнальный пептид RALF34, достигая пыльцевой трубки, способен конкурировать с RALF4/19 за связывание с рецептором и, вероятно, его взаимодействие с комплексом ANX-BUPS вызывает разрыв пыльцевой трубки и высвобождение сперматозоидов (рис. 4) [116, 118]. В недавних исследованиях показано, что вместе с FER киназы ANJEA (ANJ) и HERK1 способны взаимодействовать с секретируемыми пыльцевой трубкой RALF6/7/16/36/37 (рис. 4) для нормального функционирования процессов репродукции и предотвращения полиспермии [119]. Через другие RALF-белки (RALF23/33), но с участием тех же киназ (FER/ANJ), в рыльце цветка проходит регуляция синтеза АФК через сигнальный путь ROP GEF-ROP2-RBOHD. Этот синтез подавляется после опыления цветка, поскольку пептиды пыльцы POLLEN COAT PROTEIN B (PCP-Bs) конкурируют с RALF23/33 за связывание FER/ANJ, в конечном итоге, это способствует гидратации пыльцы и прорастанию пыльцевых трубок [117].

В группе CrRLK1L описаны также рецепторы LETUM 1 и 2, которые через образование комплекса с LLG1 принимают участие в иммунных реакциях растений через белок SUMM2

(suppressor of MKK1MKK2) – внутриклеточный иммунный рецептор группы NLR (nucleotide-binding domain leucine-rich repeat) [108].

Будучи мембраносвязанными белками, лектиновые домены которых локализуются в апопласте, малектиновые рецептор-подобные киназы контактируют со многими компонентами клеточностеночного матрикса, помимо пептидов, пектина и белков семейства LRE и LLG. Эти более широкие взаимодействия могут обеспечить сигнальную связь с молекулами, у которых отсутствует цитоплазматический домен, такими как GPI-заякоренные белки с арабиногалактановым модулем и пластоцианин-подобным доменом или связать перестройки в клеточной стенке с внутриклеточными процессами, как в случае с взаимодействием между FER и экстенсинами (LRX) – белками, тесно связанными с клеточной стенкой и содержащими лейцин-богатые повторы [20, 120]. Около сотни экстенсинов, несколько десятков малектин-подобных киназ, полтора десятка RALF-пептидов формируют разветвленную сеть возможностей для передачи сигналов от углеводных структур клеточной стенки, создавая множественную поливариантность для тонкой регуляции развития растительного организма и его взаимодействия с окружающей средой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая представленные материалы, можно отметить, что для растений характерны: а) высокая представленность белков с лектиновыми доменами; б) особая распространенность отдельных семейств лектиновых доменов; в) разнообразие набора членов некоторых семейств лектинов в зависимости от вида растения; г) модульная организация белков с лектиновыми доменами; д) сочетание лектиновых и киназных доменов в одном белке; высокая доля таких белков. Лектиновые домены, их набор и сочетание с другими элементами в структуре белка могут относиться к тем важным компонентам, которые обеспечивают “самость” различных видов растений. Лектиновые белки локализованы во всех органах растений, в различных субклеточных компартментах; они участвуют в различных процессах и выполняют разнообразные функции (рис. 3). Большинство лектинов присутствует в растительных тканях в малых количествах.

Функционирование значительной части лектинов растений связано с их взаимодействием с гликозилированными белками. Конкретные процессы, в которых задействованы такие лектины, многочисленны, что связано с разнообразием функций гликозилированных белков, свойства которых могут модулироваться за счет взаимодействия с лектинами. К этой группе относятся большинство лектиновых белков растений с ядерно-цитоплазматической локализацией, включая те, которые взаимодействуют с гликозилированными гистонами или служат шаперонами, осуществляющими контроль правильности фолдинга гликопротеина, распознавая его гликаны. Кроме того, лектиновые домены могут быть структурными элементами белков, участвуя, вероятно, в формировании дополнительных сайтов для взаимодействия с партнерами, как, например, в случае специфичных для растений кинезинов с малектиновыми доменами или галактозилтрансфераз с галектиновыми доменами.

Более половины белков с лектиновыми доменами содержат трансмембранные и киназные домены (табл. 1), причем лектиновые домены располагаются за пределами плазмалеммы и имеют доступ к гликанам клеточной стенки, а киназный домен локализован в цитоплазме. Именно такие лектиновые рецептор-подобные киназы особенно характерны для растений, что связано, вероятно, с исключительным разнообразием и многофункциональностью поли- и олигосахаридов, которые могут присутствовать в апопласте. Фрагменты полисахаридов, которые образуются при атаке патогенов, могут распознаваться лектиновыми доменами и передавать сигнал далее внутрь клетки — защитная функция

белков с лектиновыми доменами всегда предполагалась и в ряде случаев надежно продемонстрирована экспериментально.

В последние годы особый интерес и внимание вызывает функционирование лектиновых рецептор-подобных киназ и лектиновых белков клеточной стенки в ходе развития растительного организма. В частности, предполагается, что такие белки, взаимодействуя с полисахаридами и другими компонентами клеточной стенки, позволяют оценивать ее состояние (например, механические параметры) и формировать соответствующие сигналы. В этой области экспериментальная фактология только начинает накапливаться, поскольку исследования сталкиваются с серьезными методическими сложностями. Какой компонент клеточной стенки узнает лектиновый домен? Что фосфорилирует киназный домен? Какой стимул и за счет чего приводит к передаче сигнала? Для подавляющего большинства лектиновых рецептор-подобных киназ эти вопросы пока остаются без ответа. Задача осложняется тем, что формирование и передача сигнала связаны не просто с работой индивидуального белка, а с функционированием сложной сети партнеров, в которую могут входить гомо- и гетерологичные лектиновые рецептор-подобные киназы, разнообразные гликаны, белки клеточной стенки, каждый из которых кодируется, как правило, большим мультигенным семейством с ярко выраженной дифференциальной экспрессией отдельных представителей. Взаимодействия в этой сети зависят от присутствия ионов металлов и величины pH. Вся эта многовариантность, вероятно, и создает ту сложную систему связей, которая характерна для функционирования живого. При этом лектиновые домены играют особую роль в растениях, что связано с особой распространенностью и функциональной значимостью различных углеводов в этом типе организмов. А значит, предстоит расширять подходы для их исследования и формировать новые элементы в представлениях о функционировании растительного организма.

Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук” и при частичной поддержке Российского научного фонда (проект № 20-64-47036).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Peumans W.J., Van Damme E.J.M.* Lectins as plant defense proteins // *Plant Physiol.* 1995. V. 109. P. 346. <https://doi.org/10.1104/pp.109.2.347>
2. *Van Holle S., De Schutter K., Eggermont L., Tsaneva M., Dang L., Van Damme E.J.M.* Comparative study of lectin domains in model species: New insights into evolutionary dynamics // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. P. 1136. <https://doi.org/10.3390/ijms18061136>
3. *Van Holle S., Van Damme E.J.M.* Messages from the past: New insights in plant lectin evolution // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. P. 36. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00036>
4. *De Coninck T., Van Damme E.J.M.* The multiple roles of plant lectins // *Plant Sci.* 2021. V. 313. P. 111096. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.111096>
5. *Gavande P.V., Goyal A., Fontes C.M.G.A.* Carbohydrates and carbohydrate-active enzymes (CAZyme): An overview // *Glycoside Hydrolases.* 2023. P. 1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91805-3.00012-5>
6. *Boraston A.B., Bolam D.N., Gilbert H.J., Davies G.J.* Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition // *Biochem. J.* 2004. V. 382. P. 769. <https://doi.org/10.1042/BJ20040892>
7. *Van Damme E.J.M., Allen A.K., Peumans W.J.* Isolation and characterization of a lectin with exclusive specificity towards mannose from snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulbs // *FEBS lett.* 1987. V. 215. P. 140. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)80129-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80129-1)
8. *Van Damme E.J.M.* 35 years in plant lectin research: a journey from basic science to applications in agriculture and medicine // *Glycoconjugate J.* 2022. V. 39. P. 83. <https://doi.org/10.1007/s10719-021-10015-x>
9. *Nonomura A.M., Shevela D., Komath S.S., Biel K.Y., Govindjee G.* The carbon reactions of photosynthesis: role of lectins and glycoregulation // *Photosyn.* 2020. V. 58. P. 1090. <https://doi.org/10.32615/ps.2020.064>
10. *De Coninck T., Van Damme E.J.M.* Plant lectins: Handymen at the cell surface // *Cell Surf.* 2022. V. 8. P. 100091. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2022.100091>
11. *Goldstein I.J., Poretz R.D.* Isolation and chemical properties of lectins. In the lectins: properties, functions and applications in biology and medicine. Michigan: Academic Press. 1986. P. 33. ISBN: 9780124499454.
12. *Goldstein I.J., Winter H.C., Poretz R.D.* Plant lectins: tools for the study of complex carbohydrates. In *Glycoproteins II*. Amsterdam: Elsevier. 1997. P. 403. ISBN: 9780080860909.
13. *Van Damme E.J.M., Lannoo N., Peumans W.J.* Plant lectins // *Adv. Bot. Res.* 2008. V. 48. P. 107. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)00403-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)00403-5)
14. *Jiang S.Y., Ma Z., Ramachandran S.* Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants // *BMC Evol. Biol.* 2010. V. 10. P. 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-79>
15. *Bellande K., Bono J.J., Savelli B., Jamet E., Canut H.* Plant lectins and lectin receptor-like kinases: how do they sense the outside? // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. P. 1164. <https://doi.org/10.3390/ijms18061164>
16. *Kumar V., Donev E.N., Barbut F.R., Kushwah S., Mannapperuma C., Urbancsok J., Mellerowicz E.J.* Genome-wide identification of *Populus* malectin/malectin-like domain-containing proteins and expression analyses reveal novel candidates for signaling and regulation of wood development // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11. P. 588846.
17. *Eggermont L., Verstraeten B., Van Damme E.J.M.* Genome wide screening for lectin motifs in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Genome.* 2017. V. 10. P. plantgenome2017.02.0010. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2017.02.0010>
18. *Petrova N., Nazipova A., Gorshkov O., Mokshina N., Patova O., Gorshkova T.* Gene expression patterns for proteins with lectin domains in flax stem tissues are related to deposition of distinct cell wall types // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12. P. 634594. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.634594>
19. *Aglyamova A., Petrova N., Gorshkov O., Kozlova L., Gorshkova T.* Growing maize root: Lectins involved in consecutive stages of cell development // *Plants.* 2022. V. 11. P. 1799. <https://doi.org/10.3390/plants11141799>
20. *Yang H., Wang D., Guo L., Pan H., Yvon R., Garman S., Wu H., Cheung A.Y.* Malectin/Malectin-like domain-containing proteins: a repertoire of cell surface molecules with broad functional potential // *Cell Surf.* 2021. V. 7. P. 100056. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2021.100056>
21. *Zhang Q., Chen S., Bao Y., Wang D., Wang W., Chen R., Li Y., Xu G., Feng X., Liang X., Dou D.* Functional diversification analysis of soybean malectin/malectin-like domain containing receptor-like kinases in immunity by transient expression assays // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13. P. 938876. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.938876>
22. *Jing X.Q., Shalmani A., Zhou M.R., Shi P.T., Muhammad I., Shi Y., Sharif R., Li W., Liu W., Chen K.M.* Genome-wide identification of malectin/malectin-like domain containing protein family genes in rice and their expression regulation under various hormones, abiotic stresses, and heavy metal treatments // *J. Plant Growth Regul.* 2020. V. 39. P. 492. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09997-8>
23. *Азглямова А.Р., Хакимова А.Р., Горшков О.В., Горшкова Т.А.* *Physcomitrium patens* – модель для изучения эволюции белков с лектиновыми доменами у растений // *Физиология растений.* 2024. Т. 71.

24. Fouquaert E., Peumans W.J., Vandekerckhove T., Onghenaert M., Van Damme E.J. Proteins with an Euonymus lectin-like domain are ubiquitous in Embryophyta // BMC Plant Biol. 2009. V. 9. P. 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-136>
25. Tsaneva M., De Schutter K., Verstraeten B., Van Damme E.J. Lectin sequence distribution in QTLs from rice (*Oryza sativa*) suggest a role in morphological traits and stress responses // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 437. <https://doi.org/10.3390/ijms20020437>
26. Tsaneva M., Van Damme E.J.M. 130 years of plant lectin research // Glycoconjugate J. 2020. V. 37. P. 533. <https://doi.org/10.1007/s10719-020-09942-y>
27. Silva R.M.S., Buzo F.F., Pavani R.T., de Mendonça Ludgero A.K., Taylor K.M.H., Duarte C.E.M. Plant lectins: an overview // Peer Review. 2023. V. 5. P. 303. <https://doi.org/10.53660/812.prw2242>
28. Varki A., Gagneux P. Biological functions of glycans. In: Essentials of Glycobiology. 3rd ed. // New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 2015. PMID: 28876862.
29. Komath S.S., Kavitha M., Swamy M.J. Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research // Org. Biomol. Chem. 2006. V. 4. P. 973. <https://doi.org/10.1039/B515446D>
30. Choi J., Tanaka K., Cao Y., Qi Y., Qiu J., Liang Y., Lee S., Stacey G. Identification of a plant receptor for extracellular ATP // Sci. 2014. V. 343. P. 290. <https://doi.org/10.1126/science.343.6168.290>
31. Pham A.Q., Cho S.H., Nguyen C.T., Stacey G. *Arabidopsis* lectin receptor kinase P2K2 is a second plant receptor for extracellular ATP and contributes to innate immunity // Plant Physiol. 2020. V. 183. P. 1364. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01265>
32. Bouwmeester K., Govers F. *Arabidopsis* L-type lectin receptor kinases: phylogeny, classification, and expression profiles // J. Exp. Bot. 2009. V. 60. P. 4383. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp277>
33. Wang C., Zhou M., Zhang X., Yao J., Zhang Y., Mou Z. A lectin receptor kinase as a potential sensor for extracellular nicotinamide adenine dinucleotide in *Arabidopsis thaliana* // eLife. 2017. V. 6. P. e25474. <https://doi.org/10.7554/eLife.25474>
34. Pustai A., Bardocz S. Biological effects of plant lectins on the gastrointestinal tract metabolic consequences and applications // Trends Glycosci. Glycotechnol. 1996. V. 8. P. 149. <https://doi.org/10.4052/tigg.8.149>
35. Edelman G.M., Cunningham B.A., Reeke Jr G.N., Becker J.W., Waxdal M.J., Wang J.L. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1972. V. 69. P. 2580. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.9.2580>
36. Vijayan M., Chandra N. Lectins // Curr. Opin. Struct. Biol. 1999. V. 9. P. 707. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(99\)00034-2](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(99)00034-2)
37. Taylor M.E., Drickamer K. Convergent and divergent mechanisms of sugar recognition across kingdoms // Curr. Opin. Struct. Biol. 2014. V. 28. P. 14. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.07.003>
38. Barre A., Bourne Y., Van Damme E.J., Rougé, P. Overview of the structure–function relationships of mannose-specific lectins from plants, algae and fungi // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 254. <https://doi.org/10.3390/ijms20020254>
39. Шакирова Ф.М., Безрукова М.В. Современные представления о предполагаемых функциях лектинов растений // Журнал Общей биологии. 2007. Т. 68. С. 109.
40. Бабоша А.В. Лектины и проблема распознавания фитопатогенов растением-хозяином // Журнал Общей биологии. 2008. Т. 69. С. 379.
41. Рожнова Н.А., Геращенко Г.А., Бабоша А.В. Индукция фитогемагглютинирующей активности в растениях картофеля *in vitro* арахидоновой кислотой // Физиология растений. 2002. Т. 49. С. 603.
42. De Schutter K., Van Damme E.J.M. Protein-carbohydrate interactions as part of plant defense and animal immunity // Molecules. 2015. V. 20. P. 9029. <https://doi.org/10.3390/molecules20059029>
43. Van Holle S., Van Damme E.J.M. Distribution and evolution of the lectin family in soybean (*Glycine max*) // Molecules. 2015. V. 20. P. 2868. <https://doi.org/10.3390/molecules20022868>
44. Nsimba-Lubaki M., Peumans W.J. Seasonal fluctuations of lectins in barks of elderberry (*Sambucus nigra*) and black locust (*Robinia pseudoacacia*) // Plant Physiol. 1986. V. 80. P. 747. <https://doi.org/10.1104/pp.80.3.747>
45. Wetzel S., Demmers C., Greenwood J.S. Seasonally fluctuating bark proteins are a potential form of nitrogen storage in three temperate hardwoods // Planta. 1989. V. 178. P. 275. <https://doi.org/10.1007/BF00391854>
46. Berthelot K., Peruch F., Lecomte S. Highlights on *Hevea brasiliensis* (pro) hevein proteins // Biochimie. 2016. V. 127. P. 258. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2016.06.006>
47. Chrispeels M.J., Raikhel N.V. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense // Plant Cell. 1991. V. 3. P. 1. <https://doi.org/10.1105/tpc.3.1.1>
48. Iseli B., Boller T., Neuhaus J.M. The N-terminal cysteine-rich domain of tobacco class I chitinase is essential for chitin binding but not for catalytic or antifungal activity // Plant Physiol. 1993. V. 103. P. 221. <https://doi.org/10.1104/pp.103.1.221>
49. Broekaert W.F., Van Parijs J.A.N., Leyns F., Joos H., Peumans W.J. A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties // Sci. 1989. V. 245. P. 1100. <https://doi.org/10.1126/science.245.4922.1100>
50. Naithani S., Komath S.S., Nonomura A., Govindjee G. Plant lectins and their many roles: Carbohydrate-binding and beyond // J. Plant Physiol. 2021. V. 266. P. 153531. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153531>

51. Lannoo N., Van Damme E.J.M. Nucleocytoplasmic plant lectins // *Biochim. Biophys. Acta / Gen. Subj.* 2010. V. 1800. P. 190.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.07.021>
52. Yoneda Y., Imamoto-Sonobe N., Yamaizumi M., Uchida T. Reversible inhibition of protein import into the nucleus by wheat germ agglutinin injected into cultured cells // *Exp. Cell Res.* 1987. V. 173. P. 586.
[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(87\)90297-7](https://doi.org/10.1016/0014-4827(87)90297-7)
53. Delporte A., De Zaeytijd J., De Storme N., Azmi A., Geelen D., Smagghe G., Guisez Y., Van Damme E.J. Cell cycle-dependent O-GlcNAc modification of tobacco histones and their interaction with the tobacco lectin // *Plant Physiol. Biochem.* 2014. V. 83. P. 151.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.07.021>
54. Schouppe D., Ghesquière B., Menschaert G., De Vos W.H., Bourque S., Trooskens G., Proost P., Gevaert K., Van Damme E.J. Interaction of the tobacco lectin with histone proteins // *Plant Physiol.* 2011. V. 155. P. 1091.
<https://doi.org/10.1104/pp.110.170134>
55. Eggermont L., Stefanowicz K., Van Damme E.J.M. Nictaba homologs from *Arabidopsis thaliana* are involved in plant stress responses // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 8. P. 2218.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02218>
56. Gómez G., Pallás V. Identification of an *in vitro* ribonucleoprotein complex between a viroid RNA and a phloem protein from cucumber plants // *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2001. V. 14. P. 910.
<https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.7.910>
57. Wang M.B., Boulter D., Gatehouse J.A. Characterization and sequencing of cDNA clone encoding the phloem protein PP2 of *Cucurbita pepo* // *Plant Mol. Biol.* 1994. V. 24. P. 159.
<https://doi.org/10.1007/BF00040582>
58. Read S.M., Northcote D.H. Subunit structure and interactions of the phloem proteins of *Cucurbita maxima* (pumpkin) // *Eur. J. Biochem.* 1983. V. 134. P. 561.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1983.tb07603.x>
59. Lannoo N., Peumans W.J., Van Pamel E., Alvarez R., Xiong T.C., Hause G., Mazars C., Van Damme E.J. Localization and *in vitro* binding studies suggest that the cytoplasmic/nuclear tobacco lectin can interact *in situ* with high-mannose and complex N-glycans // *FEBS Lett.* 2006. V. 580. P. 6329.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.10.044>
60. Galindo-Trigo S., Grand T.M., Voigt C.A., Smith L.M. A malectin domain kinesin functions in pollen and seed development in *Arabidopsis* // *J. Exp. Bot.* 2020. V. 71. P. 1828.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eraa023>
61. Stefanowicz K., Lannoo N., Proost P., Van Damme E.J. *Arabidopsis* F-box protein containing a Nictaba-related lectin domain interacts with N-acetylglucosamine structures // *FEBS Open Bio.* 2012. V. 2. P. 151.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fob.2012.06.002>
62. Stefanowicz K., Lannoo N., Van Damme E.J.M. Plant F-box proteins-judges between life and death // *Crit. Rev. Plant Sci.* 2015. V. 34. P. 523.
<https://doi.org/10.1080/07352689.2015.1024566>
63. Van Damme E.J.M., Barre A., Rougé P., Peumans W.J. Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story // *Trends Plant Sci.* 2004. V. 9. P. 484.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.08.003>
64. Pattison R.J., Amtmann A. N-glycan production in the endoplasmic reticulum of plants // *Trends Plant Sci.* 2009. V. 14. P. 92.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.11.008>
65. Van Damme E.J.M., Smith D.F., Cummings R., Peumans W.J. Glycan arrays to decipher the specificity of plant lectins / The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-3 In *Advances in Experimental Medicine and Biology* // Ed. Wu A.M. Springer Science. 2011. P. 757.
https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7877-6_39
66. Song M., Xu W., Xiang Y., Jia H., Zhang L., Ma Z. Association of jacalin-related lectins with wheat responses to stresses revealed by transcriptional profiling // *Plant Mol. Biol.* 2014. V. 84. P. 95.
<https://doi.org/10.1007/s11103-013-0121-5>
67. Lannoo N., Van Damme E.J.M. Lectin domains at the frontiers of plant defense // *Front. Plant Sci.* 2014. V. 5. P. 397.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00397>
68. Pinedo M., Orts F., de Oliveira Carvalho A., Regente M., Soares J.R., Gomes V.M., de la Canal L. Molecular characterization of Helja, an extracellular jacalin-related protein from *Helianthus annuus*: Insights into the relationship of this protein with unconventionally secreted lectins // *J. Plant Physiol.* 2015. V. 183. P. 144.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.06.004>
69. Esch L., Schaffrath U. An update on jacalin-like lectins and their role in plant defense // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. P. 1592.
<https://doi.org/10.3390/ijms18071592>
70. Krattinger S.G., Keller B. Molecular genetics and evolution of disease resistance in cereals // *New Phytol.* 2016. V. 212. P. 320.
<https://doi.org/10.1111/nph.14097>
71. Al Atalah B., Smagghe G., Van Damme E.J.M. Oryzata, a jacalin-related lectin from rice, could protect plants against biting-chewing and piercing-sucking insects // *Plant Sci.* 2014. V. 221. P. 21.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.01.010>
72. Jiang J.F., Xu Y.Y., Chong K. Overexpression of OsJAC1, a lectin gene, suppresses the coleoptile and stem elongation in rice // *J. Integr. Plant Biol.* 2007. V. 49. P. 230.
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00428.x>
73. Ma Q.H., Liu Y.C. TaDIR13, a dirigent protein from wheat, promotes lignan biosynthesis and enhances pathogen resistance // *Plant Mol. Biol. Rep.* 2015. V. 33. P. 143.
<https://doi.org/10.1007/s11105-014-0737-x>
74. Paniagua C., Bilkova A., Jackson P., Dabrowski S., Riber W., Didi V., Houser J., Gigli-Bisceglia N., Wim-

- merova M., Budínská E., Hamann T., Hejatk J. Dirigent proteins in plants: modulating cell wall metabolism during abiotic and biotic stress exposure // J. Exp. Bot. 2017. V. 68. P. 3287.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erx141>
75. Dang L., Rougé P., Van Damme E.J.M. Amaranthin-like proteins with aerolysin domains in plants // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. P. 1368.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01368>
 76. Petrova N., Mokshina N. Using FIBexDB for in-depth analysis of flax lectin gene expression in response to *Fusarium oxysporum* infection // Plants. 2022. V. 11. P. 163.
<https://doi.org/10.3390/plants11020163>
 77. Van Hove J., Fouquaert E., Smith D.F., Proost P., Van Damme E.J. Lectin activity of the nucleocytoplasmic EUL protein from *Arabidopsis thaliana* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2011. V. 414. P. 101.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.031>
 78. Lambin J., Demirel Asci S., Dubiel M., Tsaneva M., Verbeke I., Wytynck P., De Zaeytjyd J., Smagghe G., Subramanyam K., Van Damme E.J. OsEUL lectin gene expression in rice: stress regulation, subcellular localization and tissue specificity // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. P. 185.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00185>
 79. Sahid S., Roy C., Paul S., Datta R. Rice lectin protein r40c1 imparts drought tolerance by modulating S-adenosylmethionine synthase 2, stress-associated protein 8 and chromatin-associated proteins // J. Exp. Bot. 2020. V. 71. P. 7331.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eraa400>
 80. Dubiel M., De Coninck T., Osterne V.J.S., Verbeke I., Van Damme D., Smagghe G., Van Damme E.J. The ArathEULS3 lectin ends up in stress granules and can follow an unconventional route for secretion // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 1659.
<https://doi.org/10.3390/ijms21051659>
 81. Van Hove J., De Jaeger G., De Winne N., Guisez Y., Van Damme E.J. The *Arabidopsis* lectin EULS3 is involved in stomatal closure // Plant Sci. 2015. V. 238. P. 312.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.07.005>
 82. Strasser R. Plant protein glycosylation // Glycobiology. 2016. V. 26. P. 926.
<https://doi.org/10.1093/glycob/cww023>
 83. Caramelo J.J., Parodi A.J. Getting in and out from calnexin/calreticulin cycles // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 10221.
<https://doi.org/10.1074/jbc.R700048200>
 84. Feng H., Qiu T., Yin C., Zhao X., Xu G., Qi L., Zhang Y., Peng Y., Zhao W. The rice malectin regulates plant cell death and disease resistance by participating in glycoprotein quality control // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 5819.
<https://doi.org/10.3390/ijms23105819>
 85. Strasser R., Bondili J.S., Vavra U., Schoberer J., Svoboda B., Glossl J., Léonard R., Stadlmann J., Altmann F., Steinkellner H., Mach L. A unique β 1, 3-galactosyltransferase is indispensable for the biosynthesis of N-glycans containing Lewis a structures in *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell. 2007. V. 19. P. 2278.
<https://doi.org/10.1105/tpc.107.052985>
 86. Basu D., Wang W., Ma S., DeBrosse T., Poirier E., Emch K., Soukup E., Tian L., Showalter A.M. Two hydroxyproline galactosyltransferases, GALT5 and GALT2, function in arabinogalactan-protein glycosylation, growth and development in *Arabidopsis* // PLoS One. 2015. V. 10. P. e0125624.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125624>
 87. Kim Y.S., Lee J.H., Yoon G.M., Cho H.S., Park S.W., Suh M.C., Choi D., Ha H.J., Liu J.R., Pai H.S. CHRK1, a chitinase-related receptor-like kinase in tobacco // Plant Physiol. 2000. V. 123. P. 905.
<https://doi.org/10.1104/pp.123.3.905>
 88. Liu P.L., Wan J.N., Guo Y.P., Ge S., Rao G.Y. Adaptive evolution of the chrysanthemyl diphosphate synthase gene involved in irregular monoterpene metabolism // BMC evolutionary biology. 2012. V. 12. P. 1.
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-214>
 89. Yang C., Wang E., Liu J. CERK1, more than a co-receptor in plant-microbe interactions // New Phytol. 2022. V. 234. P. 1606.
<https://doi.org/10.1111/nph.18074>
 90. Miya A., Albert P., Shinya T., Desaki Y., Ichimura K., Shirasu K., Narusaka Y., Kawakami N., Kaku H., Shibuya N. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis* // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2007. V. 104. P. 19613.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0705147104>
 91. Liu T., Liu Z., Song C., Hu Y., Han Z., She J., Fan F., Wang J., Jin C., Chang J., Zhou J.M., Chai J. Chitin-induced dimerization activates a plant immune receptor // Sci. 2012. V. 336. P. 1160.
<https://doi.org/10.1126/science.1218867>
 92. Cao Y., Liang Y., Tanaka K., Nguyen C.T., Jedrzejszak R.P., Joachimiak A., Stacey G. The kinase LYK5 is a major chitin receptor in *Arabidopsis* and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1 // eLife. 2014. V. 3. P. e03766.
<https://doi.org/10.7554/eLife.03766>
 93. Yamada K., Yamaguchi K., Shirakawa T., Nakagami H., Mine A., Ishikawa K., Fujiwara M., Narusaka M., Narusaka Y., Ichimura K., Kobayashi Y., Matsui H., Nomura Y., Nomoto M., Tada Y. et al. The *Arabidopsis* CERK 1-associated kinase PBL 27 connects chitin perception to MAPK activation // EMBO J. 2016. V. 35. P. 2468.
<https://doi.org/10.15252/embj.201694248>
 94. Willmann R., Lajunen H.M., Erbs G., Newman M.A., Kolb D., Tsuda K., Katagiri F., Fliegmann J., Bono J.J., Cullimore J.V., Jehle A.K., Götz F., Kulik A., Molinaro A., Lipka V. et al. *Arabidopsis* lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2011. V. 108. P. 19824.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1112862108>

95. *Desaki Y., Miyata K., Suzuki M., Shibuya N., Kaku H.* Plant immunity and symbiosis signaling mediated by LysM receptors // *Innate Immun.* 2018. V. 24. P. 92. <https://doi.org/10.1177/1753425917738885>
96. *Tanaka K., Choi J., Cao Y., Stacey G.* Extracellular ATP acts as a damage-associated molecular pattern (DAMP) signal in plants // *Front. Plant Sci.* 2014. V. 5. P. 446. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00446>
97. *Gouget A., Senchou V., Govers F., Sanson A., Barre A., Rougé P., Pont-Lezica R., Canut H.* Lectin receptor kinases participate in protein-protein interactions to mediate plasma membrane-cell wall adhesions in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2006. V. 140. P. 81. <https://doi.org/10.1104/pp.105.066464>
98. *Hwang I.S., Hwang B.K.* The pepper mannose-binding lectin gene CaMBL1 is required to regulate cell death and defense responses to microbial pathogens // *Plant Physiol.* 2011. V. 155. P. 447. <https://doi.org/10.1104/pp.110.164848>
99. *Luo X., Wu W., Liang Y., Xu N., Wang Z., Zou H., Liu J.* Tyrosine phosphorylation of the lectin receptor-like kinase LORE regulates plant immunity // *EMBO J.* 2020. V. 39. P. e102856. <https://doi.org/10.15252/embj.2019102856>
100. *Labbé J., Muchero W., Czarnecki O., Wang J., Wang X., Bryan A.C., Zheng K., Yongil Y., Xie M., Zhang J., Wang D., Meidl P., Wang H., Morrell-Falvey J.L., Cope K.R. et al.* Mediation of plant-mycorrhizal interaction by a lectin receptor-like kinase // *Nat. Plants.* 2019. V. 5. P. 676. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0469-x>
101. *Catanzariti A.M., Lim G.T.T., Jones D.A.* The tomato I-3 gene: a novel gene for resistance to *Fusarium* wilt disease // *New Phytol.* 2015. V. 207. P. 106. <https://doi.org/10.1111/nph.13348>
102. *Nasrallah J.B., Nasrallah M.E.* S-locus receptor kinase signalling // *Biochem. Soc. Trans.* 2014. V. 42. P. 313. <https://doi.org/10.1042/BST20130222>
103. *Ma R., Han Z., Hu Z., Lin G., Gong X., Zhang H., Nasrallah J.B., Chai J.* Structural basis for specific self-incompatibility response in Brassica // *Cell Res.* 2016. V. 26. P. 1320. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.129>
104. *Deb S., Sankaranarayanan S., Wewala G., Widdup E., Samuel M.A.* The S-domain receptor kinase *Arabidopsis* receptor kinase2 and the U box/armadillo repeat-containing E3 ubiquitin ligase9 module mediates lateral root development under phosphate starvation in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2014. V. 165. P. 1647. <https://doi.org/10.1104/pp.114.244376>
105. *Feng W., Kita D., Peaucelle A., Cartwright H.N., Doan V., Duan Q., Liu M., Maman J., Leonie S., Schmitz-Thom I., Yvon R., Kudla J., Wu H., Cheung A.Y., Dinnyen J.R.* The FERONIA receptor kinase maintains cell-wall integrity during salt stress through Ca²⁺ signaling // *Curr. Biol.* 2018. V. 28. P. 666. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.023>
106. *Ge Z., Dresselhaus T., Qu L.J.* How CrRLK1L receptor complexes perceive RALF signals // *Trends Plant Sci.* 2019. V. 24. P. 978. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.09.002>
107. *Franck C.M., Westermann J., Boisson-Dernier A.* Plant malectin-like receptor kinases: from cell wall integrity to immunity and beyond // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2018. V. 69. P. 301. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040557>
108. *Ortiz-Morea F.A., Liu J., Shan L., He P.* Malectin-like receptor kinases as protector deities in plant immunity // *Nat. Plants.* 2022. V. 8. P. 27. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-01028-3>
109. *Tang W., Lin W., Zhou X., Guo J., Dang X., Li B., Lin D., Yang Z.* Mechano-transduction via the pectin-FERONIA complex activates ROP6 GTPase signaling in *Arabidopsis* pavement cell morphogenesis // *Curr. Biol.* 2022. V. 32. P. 508. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.11.031>
110. *Zhang R., Shi P.T., Zhou M., Liu H.Z., Xu X.J., Liu W.T., Chen K.M.* Rapid alkalization factor: function, regulation, and potential applications in agriculture // *Stress Biol.* 2023. V. 3. P. 16. <https://doi.org/10.1007/s44154-023-00093-2>
111. *Haruta M., Sabat G., Stecker K., Minkoff B.B., Sussman M.R.* A peptide hormone and its receptor protein kinase regulate plant cell expansion // *Sci.* 2014. V. 343. P. 408. <https://doi.org/10.1126/science.1244454>
112. *Gonneau M., Desprez T., Martin M., Doblas V.G., Bacete L., Miart F., Sormani R., Hematy K., Renou J., Landrein B., Murphy E., Van De Cotte B., Vernhettes S., De Smet I., Höfte H.* Receptor kinase THESEUS1 is a rapid alkalization factor 34 receptor in *Arabidopsis* // *Curr. Biol.* 2018. V. 28. P. 2452. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.075>
113. *Hématy K., Sado P.E., Van Tuinen A., Rochange S., Desnos T., Balzergue S., Pelletier S., Renou J., Höfte H.* A receptor-like kinase mediates the response of *Arabidopsis* cells to the inhibition of cellulose synthesis // *Curr. Biol.* 2007. V. 17. P. 922. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.05.018>
114. *Guo H., Li L., Ye H., Yu X., Algreen A., Yin Y.* Three related receptor-like kinases are required for optimal cell elongation in *Arabidopsis thaliana* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009. V. 106. P. 7648. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812346106>
115. *Schoenaers S., Balcerowicz D., Breen G., Hill K., Zdanio M., Mouille G., Holman T.J., Oh J., Wilson M.H., Nikonorova N., Dai Vu L., De Smet I., Swarup R., De Vos W.H., Pintelon I. et al.* The auxin-regulated CrRLK1L kinase ERULUS controls cell wall composition during root hair tip growth // *Curr. Biol.* 2018. V. 28. P. 722. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.050>
116. *Ge Z., Bergonci T., Zhao Y., Zou Y., Du S., Liu M.C., Luo X., Ruan H., García-Valencia L.E., Zhong S., Hou S., Huang Q., Lai L., Moura D.S., Gu H. et al.* *Arabidopsis* pollen tube integrity and sperm release are

- regulated by RALF-mediated signaling // *Sci.* 2017. V. 358. P. 1596.
<https://doi.org/10.1126/science.aao3642>
117. Gao S., Li C. CrRLK1L receptor kinases-regulated pollen-pistil interactions // *Reproduction and Breeding*. 2022. V. 2. P. 113.
<https://doi.org/10.1016/j.repbre.2022.11.002>
118. Liang X., Zhou J.M. The secret of fertilization in flowering plants unveiled // *Sci. Bull.* 2018. V. 63. P. 408.
<https://doi.org/10.1016/j.scib.2018.02.010>
119. Zhong S., Li L., Wang Z., Ge Z., Li Q., Bleckmann A., Wang J., Song Z., Shi Y., Liu T., Li L., Zhou H., Wang Y., Zhang L., Wu H. et al. RALF peptide signaling controls the polytubey block in *Arabidopsis* // *Sci.* 2022. V. 375. P. 290.
<https://doi.org/10.1126/science.abl4683>
120. Hou Y., Guo X., Cyprys P., Zhang Y., Bleckmann A., Cai L., Huang Q., Luo Y., Gu H., Dresselhaus T., Dong J., Qu L.J. Maternal ENODLs are required for pollen tube reception in *Arabidopsis* // *Curr. Biol.* 2016. V. 26. P. 2343.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.06.053>

УДК 581.1

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ОБНОВЛЕНИЯ КЛЕТОК КОРНЕВОГО ЧЕХЛИКА У *Arabidopsis thaliana* L.

© 2024 г. В. А. Черенко^{a, b}, Н. А. Омелянчук^a, Е. В. Землянская^{a, b, *}

^aФедеральное государственное бюджетное научное учреждение “Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”, Новосибирск, Россия

^bФедеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Новосибирский национальный исследовательский государственный университет”, Новосибирск, Россия

*e-mail: ezemlyanskaya@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 03.11.2023 г.

После доработки 24.11.2023 г.

Принята к публикации 24.11.2023 г.

Синхронизация пространственно разобщенных процессов деления и потери клеток играет первостепенную роль в обновлении и поддержании структуры органов и тканей, но о генетических механизмах ее регуляции на данный момент известно очень немного. У растений быстрому обновлению подвержен корневой чехлик, который располагается на кончике корня, защищая от механических повреждений нишу ствольных клеток и выполняя ряд других важных функций. Несмотря на непрерывное поступление и дифференцировку дочерних клеток от деления инициалей (ствольных клеток), корневой чехлик не увеличивается в размерах благодаря регулярному удалению дифференцированных клеток на внешнем его конце. Для строгого поддержания постоянства размера корневой чехлика важно, чтобы деления ствольных клеток были синхронизированы с удалением клеток внешнего слоя. У *Arabidopsis thaliana*, модельного объекта генетики растений, корневой чехлик имеет очень простую упорядоченную структуру, а слущивание старых клеток происходит единым слоем, что делает этот вид удобной моделью для исследования механизмов регуляции обновления клеток корневой чехлика. В обзоре рассмотрено поддержание гомеостаза структуры и размера корневой чехлика у *A. thaliana*, обсуждены данные по генетическому контролю этого процесса и возможные перспективные направления дальнейших исследований в этой области.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, дифференцировка клеток колумеллы, запрограммированная гибель клеток, инициалы колумеллы, транскрипционный фактор, фитогормоны.

DOI: 10.31857/S0015330324020024, EDN: OBXANC

ВВЕДЕНИЕ

Корни служат растениям для закрепления в почве и поглощения воды с растворенными в ней солями [1, 2]. В корне выделяют три зоны: на самом конце располагается меристематическая зона (также называемая зоной делений), за ней по направлению к побегу (проксимально) следует зона удлинения (зона роста), и далее — зона дифференцировки (зона созревания, или всасывания) (рис. 1). Область перехода между меристематической зоной и зоной удлинения часто выделяют в отдельную транзитную зону. У наземных растений, начиная с сосудистых спорых, на дистальном конце корня дополнительно присутствует специальный орган, называемый корневым чехликом (рис. 1а). Он защищает апикальную меристему от повреждений, способ-

ствует адаптации растений к различным почвам, а также участвует в формировании ответных реакций на целый ряд внешних стимулов: гравитацию, механические раздражители, патогены, доступность воды, минеральных веществ и другие условия [1, 2].

Корневой чехлик состоит из двух отдельных частей (рис. 1б): центрально расположенной колумеллы и окружающего ее и меристему корня бокового корневой чехлика (БКЧ) [3]. Анатомия корневой чехлика *Arabidopsis thaliana* имеет сходную, хотя и более простую клеточную организацию, чем та, которая описана для других представителей семейства Brassicaceae. Ниша ствольных клеток корня состоит из трех ярусов. Центральный ярус составляют клетки покоящегося (организационного) центра и инициалы коры. Верхний ярус занимают инициалы стелы. Корневой чехлик продуцируют инициалы нижнего яруса. Среди них выделяют 12 инициалей

Сокращения: БКЧ — боковой корневой чехлик; ТФ — транскрипционный фактор

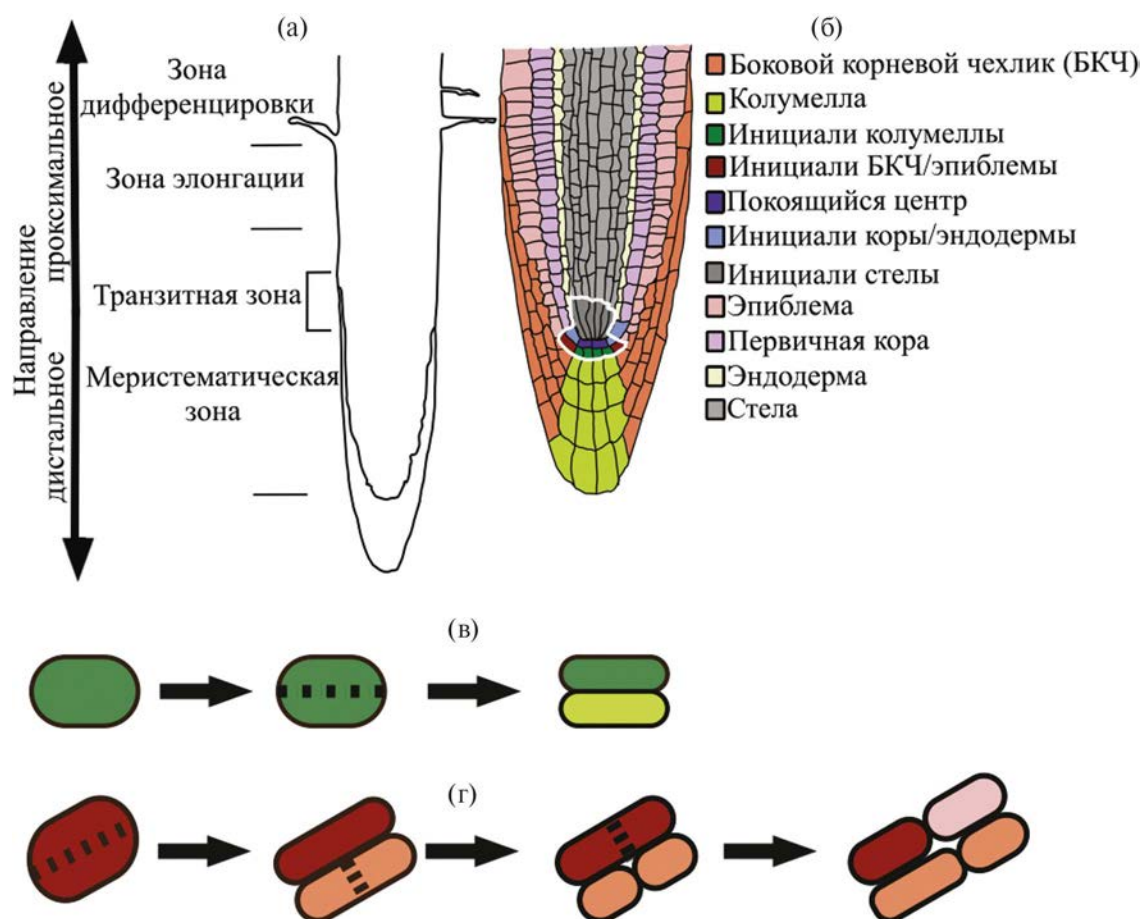


Рис. 1. Зоны корня и клеточная структура корневого чехлика: а — схематическое изображение строения корня *Arabidopsis thaliana* с указанием зон; б — клеточная организация кончика корня *A. thaliana*; белым цветом выделена ниша стволовых клеток, куда входит покоящийся центр и стволовые клетки (инициали); в — продукция клеток колумеллы путем асимметричных периклиальных делений инициалей колумеллы; г — продукция клеток бокового корневого чехлика (БКЧ) и эпиблемы в результате последовательных периклиального и антиклинального делений инициалей эпиблемы и БКЧ соответственно. Пунктирной линией на панелях (в) и (г) отмечена плоскость деления. Цветовая кодировка на этих панелях соответствует панели (б).

колумеллы, которые в поперечной проекции организованы в виде круга с четырьмя центральными клетками, окруженными оставшимися восемью. Клетки колумеллы формируются в результате периклиального (параллельного поверхности органа) деления этих инициалей. Потомки каждой инициали образуют вертикальный ряд, располагаясь строго друг под другом (рис. 1в). Благодаря такой простой организации с легко отслеживаемой клональностью колумелла *A. thaliana* широко используется как модель для изучения функционирования ниши стволовых клеток у растений. Инициали колумеллы окружены 16 инициалами, которые дают начало клеткам БКЧ и эпиблемы. Антиклинальное (перпендикулярное поверхности органа) деление этой инициали продуцирует две клетки, из которых внутренняя остается стволовой, а внешняя дает начало эпиблеме; периклиальное деление инициали продуцирует наружу клетки БКЧ (рис. 1г). У *A. thaliana* корневого чех-

лик содержит от 180 до 260 клеток [2]. У других видов его размер может быть существенно больше, например, у *Pisum sativum* корневого чехлик имеет от 4000 до 21000 клеток.

Поскольку корневого чехлик находится на поверхности растущего сквозь почву корня, его внешний слой испытывает постоянную механическую нагрузку с повышенным риском повреждений и регулярно сменяется [1, 2]. Это обстоятельство требует постоянного возобновления клеток корневого чехлика, которое обеспечивается регулярными делениями его инициалей. В то же время для функционирования корневого чехлика важно, чтобы не происходило его чрезмерного разрастания и строго поддерживалась его апикальная локализация. Показано, например, что увеличение размеров БКЧ, которое наблюдается у мутантных растений *A. thaliana* с нарушением функций гена *ANAC033/SOMBRERO (SMB)*, может приводить к замедлению роста корня в длину [4]. Таким образом, возникает не-

обходимость обеспечения баланса между продукцией клеток и их удалением. Далее в обзоре мы рассмотрим клеточные механизмы структурного гомеостаза корневого чехлика у *A. thaliana*, а также генетический контроль этих процессов.

КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СТРУКТУРНОГО ГОМЕОСТАЗА КОРНЕВОГО ЧЕХЛИКА

Периклиналильные деления инициалей колумеллы и БКЧ скоординированы и приводят к формированию нового слоя корневого чехлика, сдвигая более старые слои ближе к периферии [1, 2]. Для большинства дочерних клеток инициалей колумеллы характерна быстрая дифференцировка без делений, тем не менее, деления клеток колумеллы наблюдаются, но достаточно редко [5]. Дочерние клетки инициалей колумеллы дифференцируются в статолиты — клетки, воспринимающие гравитационные сигналы [6, 7]. Они начинают накапливать крахмал внутри амилопластов, что приводит к формированию крахмальных зерен (статолитов), оседающих под действием силы тяжести. По мере своей дифференцировки клетки колумеллы осуществляют функциональный переход от гравитационно-чувствительных статолитов к секреторным клеткам [2, 8]. Этот процесс сопровождается деградацией крахмальных зерен, объединением вакуолей и увеличением количества органелл, вовлеченных в секреторную функцию. В отличие от потомков инициалей колумеллы клетки БКЧ, продуцируемые в результате периклиналильного деления инициалей БКЧ и эпibleмы, в течение некоторого времени способны делиться в антиклиналильной плоскости, что наряду с растяжением клеток обеспечивает рост БКЧ вдоль оси корня [9, 10]. Клетки БКЧ не имеют статолитов и дифференцируются только в секреторные клетки [2, 11].

Сразу после прорастания семени в ювенильном корневом чехлике *A. thaliana* наблюдается четыре (реже — три) слоя клеток, включая инициали [12, 13]. К пятому дню после прорастания размер корневого чехлика обычно достигает пяти клеточных слоев, такой орган считается зрелым. На этом этапе запускается регулярное удаление внешнего слоя корневого чехлика, происходящие примерно каждые 36 ч [12, 14, 15].

В настоящее время описаны два механизма удаления старых клеток корневого чехлика: (1) их запрограммированная гибель в БКЧ и (2) слушивание живых клеток с поверхности корня в колумелле и БКЧ [1]. У *A. thaliana* механизмы запрограммированной гибели активируются в проксимальных клетках внешнего слоя БКЧ, которые находятся в транзитной зоне

корня, расположенной на границе между меристематической зоной и зоной удлинения [4, 16] (рис. 2). Эти клетки погибают, после чего подвергаются быстрому активному автолизу. Таким образом, запрограммированная гибель является заключительным этапом развития клеток БКЧ. В процессе роста корня механизмы гибели последовательно активируются в ряду клонально-родственных клеток наружного слоя БКЧ, которые приходят на смену погибшим клеткам. По мере удаления этих клеток “внешним” становится более молодой слой БКЧ, в проксимальных клетках которого в свою очередь аналогичным образом активируются механизмы запрограммированной гибели.

Удаление клеток внешнего слоя корневого чехлика в его апикальной части, в том числе секреторных клеток колумеллы путем их слушивания в почву синхронизировано с гибелью клеток в проксимальной области БКЧ [4, 17–18]. Отделившиеся от корня клетки носят название пограничных [19–21]. В течение некоторого времени они остаются живыми и выполняют секреторную функцию, преобразуя физические и химические свойства окружающей корень среды, тем самым облегчая движение корня сквозь почву, защищая его от патогенов и обеспечивая взаимодействие с симбиотическими организмами (обзоры в [1, 11, 19, 20]). В отличие от многих видов, у которых с поверхности корня слушиваются отдельные клетки, у *Brassicaceae*, включая *A. thaliana*, отделение клеток происходит единым слоем с сохранением контактов между ними [21] (рис. 2). На первом этапе слушивания появляется разрыв во внешнем клеточном слое в проксимальной области БКЧ на уровне чуть выше покоящегося центра и начинается отслойка клеток этого слоя сверху вниз [4, 14, 15]. Этому событию предшествует деление инициалей колумеллы, что обеспечивает скоординированность процессов генерации и элиминации клеточных слоев в корневом чехлике [12]. Через некоторое время детектируется отделение наружного слоя клеток БКЧ, окружающих колумеллу [4, 14, 15]. Последними отделяются клетки внешнего слоя колумеллы. Отслоение обеспечивается путем реорганизации клеточных стенок [12, 22, 23]. Отделившийся слой пограничных клеток “соскальзывает” с кончика растущего корня и остается сбоку от него [14]. Весь процесс от начала и до конца слушивания занимает в среднем 18 ч, и примерно 18 ч проходит до инициации следующего слушивания [14]. Несмотря на сопряженность процессов генерации и элиминации клеточных слоев корневого чехлика, есть данные, что его размер все-таки немного прогрессирует с возрастом. В частности, Wein с соавт. [13] к 10 дню после прорастания наблюдали шесть клеточных слоев в составе колумеллы *A. thaliana*.

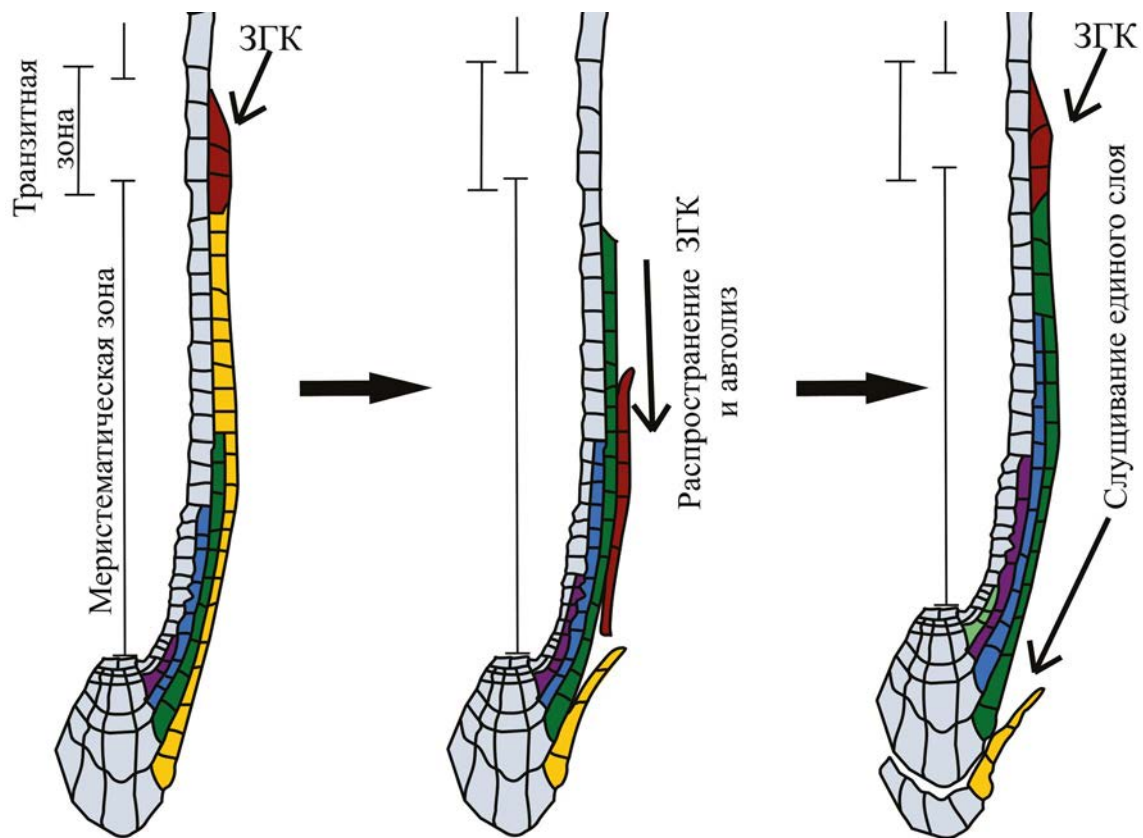


Рис. 2. Процесс удаления старых клеток корневого чехлика. Цветовая кодировка (желтый, светло- и темно-зеленый, синий, фиолетовый) указывает на отдельные слои бокового корневого чехлика. Красным цветом отмечена запрограммированная гибель клеток (ЗГК) во внешнем слое бокового корневого чехлика. Ключевые события удаления внешнего слоя клеток корневого чехлика указаны тонкими стрелками. К ним относятся запрограммированная гибель клеток бокового корневого чехлика, автолиз погибших клеток, а также слушивание единого слоя живых клеток колумеллы.

ГОРМОНАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ КЛЕТОЧНОЙ ДИНАМИКИ В КОРНЕВОМ ЧЕХЛИКЕ

Ауксин — основополагающий регулятор структуры корневого чехлика

Развитие корневого чехлика регулируется фитогормонами, из которых первостепенное значение имеет ауксин [24, 25]. В кончике корня *A. thaliana* максимум концентрации ауксина маркирует покоящийся центр, от которого вдоль центральной оси в проксимальном и дистальном направлениях снижается концентрация ауксина [26–29]. Ключевой вклад в формирование градиента ауксина в кончике корня вносит его активный транспорт, который обеспечивают белки-транспортёры семейства PINFORMED (PIN), а именно: PIN1, PIN2, PIN3, PIN4 и PIN7 [27]. Распределение этих белков на мембранах клеток корня (от равномерного до полярного) определяет направление потоков ауксина: акропетальный (по направлению кончику) — в стеле, базипетальный (по направлению к побегу) — в БКЧ и эпиблеме, разнонаправленный — в колумелле. Такая организация потоков ауксина обеспечивает форми-

рование и правильное позиционирование максимума концентрации фитогормона [28, 29]. В колумелле перераспределение ауксина осуществляют белки PIN3, PIN4 и PIN7, в БКЧ — PIN2 [27, 30, 31].

Градиент ауксина с максимумом в покоящемся центре играет принципиальную роль при определении состояния клеток в растущем корне, оказывая существенное влияние на их способности к делению, росту и дифференцировке [32–34]. Так, повышение уровня ауксина путем экзогенной обработки проростков этим фитогормоном или ингибитором его транспорта (нафтилфталомовой кислотой), а также в трансгенных линиях с повышенным уровнем биосинтеза ауксина приводит к потере слоя инициалей колумеллы из-за их преждевременной дифференцировки в статолиты [24, 25]. Снижение уровня ауксина в результате мутаций, нарушающих биосинтез ауксина, передачу его сигнала или транспорт ауксина в колумелле, наоборот, приводит к формированию нескольких слоев инициалей колумеллы [24]. В то же время специфическое подавление сигнального пути

ауксина в клетках покоящегося центра вызывает дифференцировку инициалей колумеллы [32]. Неоднозначность эффектов ауксина потенциально может объясняться комбинаторной моделью действия элементов сигнального пути ауксина [33, 35], а также взаимосвязью этого фитогормона с другими регуляторами поддержания ниши стволовых клеток, такими как транскрипционный фактор (ТФ) WUSCHEL HOMEODOMAIN 5 (WOX5) [36], PLETHORA (PLT) [37, 38], и регуляторным контуром SCARECROW (SCR)—SHORT ROOT (SHR)—RETINOBLASTOMA-RELATED (RBR) [39]. Таким образом, детали молекулярного механизма, опосредующего влияние ауксина на клетки корневого чехлика, еще только предстоит выяснить.

Взаимоотношения ауксина и цитокинина в регуляции клеточной динамики

Цитокинин известен как регулятор деления клеток [40, 41]. В корне концентрационный максимум цитокинина расположен в корневом чехлике, причем он характерен для всех трех наиболее активных цитокининов: изопентил-аденина, цис- и транс-зеатинов как в свободной, так и конъюгированной формах [42]. Высокий уровень цитокинина в корневом чехлике коррелирует с высоким уровнем экспрессии генов, кодирующих цитокинин-деактивирующие ферменты CKX (CYTOKININ OXIDASE/DEHYDROGENASE) и UGT (URIDINE DIPHOSPHATE GLUCOSYLTRANSFERASE). Все три рецептора цитокинина AHK2 (ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 2), AHK3 и AHK4 экспрессируются также на самом высоком уровне в колумелле [43]. Сенсор цитокинина *TCS:GFP*, экспрессирующий GFP под контролем цитокинин-чувствительного синтетического промотора, выявляет цитокининовый сигнал в колумелле и БКЧ, начиная с четвертого дня после прорастания, и максимум сигнала приходится на периферические клетки колумеллы [44]. Высокий уровень сигнала цитокинина в колумелле не усиливается при обработке экзогенным цитокинином, что может говорить об его предельном уровне [45]. Определение содержания цитокинина и ауксина в одной и той же клеточной популяции с помощью сортировки флуоресцентно активированных клеток и жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией показало, что в корневом чехлике уровень цитокинина выше, чем ауксина [42], при этом именно ауксин увеличивает здесь концентрацию цитокинина [44]. С другой стороны, в БКЧ цитокинин быстро снижает уровень свободного ауксина за счет фактора цитокининового ответа ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 1 (ARR1), напрямую контролирующего транскрипцию внутриклеточного транс-

портера ауксина PIN5 и конъюгатора ауксина GRETCHEN HAGEN 3.17 (GH3.17) [46]. PIN5 перекачивает ауксин из цитоплазмы в эндоплазматический ретикулум, где GH3.17 инактивирует его связыванием с аминокислотами. Наряду с GH3.17 цитокинин в БКЧ также повышает через ARR1 уровень других конъюгаторов ауксина GH3.5 и GH3.6. Таким образом, цитокинин модулирует базипетальный поток ауксина через БКЧ и тем самым регулирует градиент ауксина в кончике корня.

Гормональная настройка клеточной динамики путем модуляции сигнала ауксина

Многие гормоны, например, салициловая кислота, осуществляют контроль дифференцировки клеток колумеллы через регуляцию распределения ауксина. У мутантов с повышенным эндогенным уровнем салициловой кислоты или при обработке низкими дозами этого гормона (10 мкМ) в течение 5 дней инициали колумеллы накапливают крахмал, т. е. преждевременно дифференцируются в клетки колумеллы, при этом у 40–70% растений слой инициалей колумеллы вообще исчезает [47]. Напротив, обработка в течение такого же срока салициловой кислотой с немного более высокой концентрацией (30 мкМ) приводит к образованию двух-четырех дополнительных слоев клеток, которые экспрессируют маркеры как покоящегося центра (WOX5), так и инициалей колумеллы (J2341), и в которых отсутствуют крахмальные гранулы [48]. Обработка еще более высокими концентрациями (150 мкМ) не меняет структуру колумеллы, но увеличивает размер ее клеток и ингибирует в них образование крахмала.

Различия в реакциях колумеллы на разные дозы салициловой кислоты можно объяснить различным влиянием этих доз на распределение ауксина [47–50]. При обработке низкой дозой салициловой кислоты (30 мкМ) концентрация ауксина в колумелле повышается за счет увеличения его биосинтеза и уровня PIN1, приносящего ауксин из стебля, а также за счет подавления PIN2 и PIN7, перераспределяющих ауксин в базипетальный поток [48]. Повышенный уровень ауксина приводит к преждевременной дифференцировке инициалей колумеллы. Более высокие концентрации салициловой кислоты снижают уровни ауксина в покоящемся центре и в инициалах колумеллы, главным образом за счет ингибирования PIN1, что приводит к приостановке дифференцировки. Длительная обработка низкими концентрациями салициловой кислоты также приводит к нарушению плоскостей и увеличению числа делений инициалей БКЧ и эпibleмы.

Повышение эндогенного уровня брассино-стероидов или обработка этими гормонами в

концентрациях от 1 наномоля и выше вызывают появление крахмальных зерен в инициалах колумеллы, т. е. их дифференцировку [51]. Уже при 1 наномоле brassinosterоидов у 18% растений дифференцируется весь слой инициалей колумеллы [52]. Наряду с этим уменьшается уровень крахмала в клетках колумеллы, и в нескольких клетках в ее нижних рядах крахмальные зерна вообще не определяются. Снижение биосинтеза brassinosterоидов или обработка их низкими концентрациями (от фемто до 0.1 наномоля) имеют противоположный результат, т. е. ингибируют дифференцировку дочерних клеток инициалей колумеллы, что приводит к появлению двух слоев инициалей колумеллы и процент растений с этой аномалией растет вместе с концентрацией в вышеуказанных пределах. Одновременно с этим падает число слоев колумеллы и при обработке 0.1 наномолем brassinosterоида около 25%, 68% и 7% растений имеют, соответственно, четыре, три и два слоя. Сигнальный путь brassinosterоидов при переходе гормонального сигнала от рецепторов, киназ и фосфатаз к ТФ разделяется на BZR1 (BRASSINAZOLE-RESISTANT 1) и BES1 (BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1) опосредованные сигнальные каскады [53], из которых BES1 активирует дифференцировку клеток колумеллы [51], в то время как BZR1 каскад ее подавляет [52]. BZR1 каскад частично действует через уменьшение стимуляции ауксином дифференцировки клеток колумеллы.

В корнях, обработанных жасмоновой кислотой, происходит комплексное нарушение дифференцировки колумеллы, так как маркер инициалей колумеллы регистрируется более чем в одном слое, но при этом часть инициалей колумеллы имеет крахмальные зерна [54]. Показано, что индуцируемый жасмонатами ТФ MYC2 подавляет экспрессию генов ТФ *PLT1* и *PLT2*, участвующих в ауксиновом контроле дифференцировки колумеллы.

В корне у 5-дневных проростков абсцизовая кислота (АБК) имеет наибольший уровень в покоящемся центре и колумелле, и этот уровень значительно снижается, начиная с 10-го дня после прорастания [13, 55]. Обработка АБК 5-дневных проростков дает наиболее высокий сигнал также в кончике корня с максимумом в колумелле, но при обработке 10–15 дневных проростков сигнал в корне гораздо слабее и примерно одинаков для всех типов клеток [13]. Блокирование биосинтеза АБК приводит к накоплению крахмала не только в инициалах колумеллы, но и в покоящемся центре [56]. Подавление АБК дифференцировки дочерних клеток инициалей колумеллы требует участия двух ауксин-индуцируемых генов, *WOX5* и *AUXIN RESPONSE FACTOR 5/MONOPTEROS (ARF5/MP)* [56–58].

В колумелле этилен увеличивает число слущенных слоев, а ингибитор биосинтеза этилена (2-aminoethoxyvinyl glycine, AVG) уменьшает их число [12]. Эндогенный этилен синтезируется во внешнем и подлежащем слоях БКЧ, где специфически экспрессируется ACS8 (1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 8) катализирующая, как и остальные ACS лимитирующую стадию в биосинтезе этилена [59]. Обработка ауксином значительно повышает экспрессию ACS8 в этих слоях. Обработка этиленом увеличивает интенсивность сигнала ауксина в БКЧ и это увеличение зависит от AUX1 транспортера ауксина, т. е. связано с перераспределением этого гормона [60]. Гиббереллин усиливает ауксиновый сигнал в колумелле [61].

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПЕРЕХОДА ОТ ДЕЛЕНИЙ К ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ КЛЕТОК В КОРНЕВОМ ЧЕХЛИКЕ

Генетический анализ и локализация экспрессии генов в колумелле показали, что переход клеток от делений к дифференцировке находится под контролем нескольких независимых регуляторных путей [5]. Один из них включает ТФ FEZ и SMB семейства NAC (NAM, ATAF and CUC), а также WOX5 семейства WUSCHEL, домены экспрессии которых приведены на рис. 3. ТФ FEZ активирует клеточные деления в инициалах корневого чехлика и снижение его активности приводит к уменьшению числа слоев в колумелле и БКЧ [18]. Количество FEZ в клетке ограничивается по принципу отрицательной обратной связи путем активации гена *SMB*. ТФ SMB подавляет ген *FEZ* в дочерних клетках инициалей колумеллы, ограничивая таким образом их способность к делению и стимулируя дифференцировку. *WOX5* экспрессируется в покоящемся центре, где он препятствует делению клеток [57, 62]. С другой стороны, *WOX5* в покоящемся центре активирует неуставленные до настоящего времени сигнальные компоненты, которые, мигрируя в инициали колумеллы, подавляют экспрессию *SMB* и тем самым снимают ингибирование с *FEZ*, стимулируя деление инициалей [5, 63]. Помимо этого, *WOX5* поддерживает способность инициалей колумеллы к делению, подавляя ген ТФ *CYCLING DOF FACTOR 4 (CDF4)*, избыток которого приводит к преждевременной дифференцировке инициалей [64]. Соответственно, у мутантов *wox5* инициали колумеллы начинают дифференцироваться и накапливать крахмал, тогда как сверхэкспрессия *WOX5* приводит к остановке дифференцировки дочерних клеток инициалей не только колумеллы, но и БКЧ [57, 64].

Дифференцированные клетки колумеллы продуцируют пептидные гормоны CLAVATA3/

EMBRYO SURROUNDING REGION-RELATED 40 (CLE40), CLE16 и CLE17 [65, 66], сигналы которых воспринимаются протеинкиназным рецепторным комплексом CLAVATA1 (CLV1)-ARABIDOPSIS CRINKLY4 (ACR4), вызывая дифференцировку клеток колумеллы путем подавления WOX5 [65–67] (рис. 3). Посредником выступает фосфатаза PROTEIN PHOSPHATASE 2A (PP2A), на каталитическую субъединицу которой, PP2A-3, посттрансляционно воздействует ACR4 [68]. Еще одним участником сигнального пути CLE пептидов в поддержании дифференцированного состояния клеток колумеллы является E3 убиквитинлигаза PLANT U-BOX4 (PUB4) [69].

Регуляторный путь, связанный с ауксином, включает в себя ТФ AUXIN RESPONSE

FACTOR 10 (ARF10) и ARF16, опосредующих транскрипционный ответ генов на этот фитогормон, а также микроРНК *miR160*, для которой мРНК *ARF10* и *ARF16* являются прямыми мишенями [24, 70] (рис. 3). В то время как обработка ауксином стимулирует дифференцировку клеток колумеллы и снижает скорость деления инициалей [24, 25], *miR160* активирует деление инициалей, подавляя *ARF10* и *ARF16* [70]. Сверхэкспрессия *miR160* или мутации генов *ARF10* и *ARF16* приводят к неконтролируемым делениям клеток в колумелле и блокируют их дифференцировку, в результате чего формируется опухоль на кончике корня и утрачивается гравитропизм. В поддержании стволового состояния инициалей колумеллы участвует также ген *ULTRAPETALA1 (ULT1)* [71]. Мутация это-

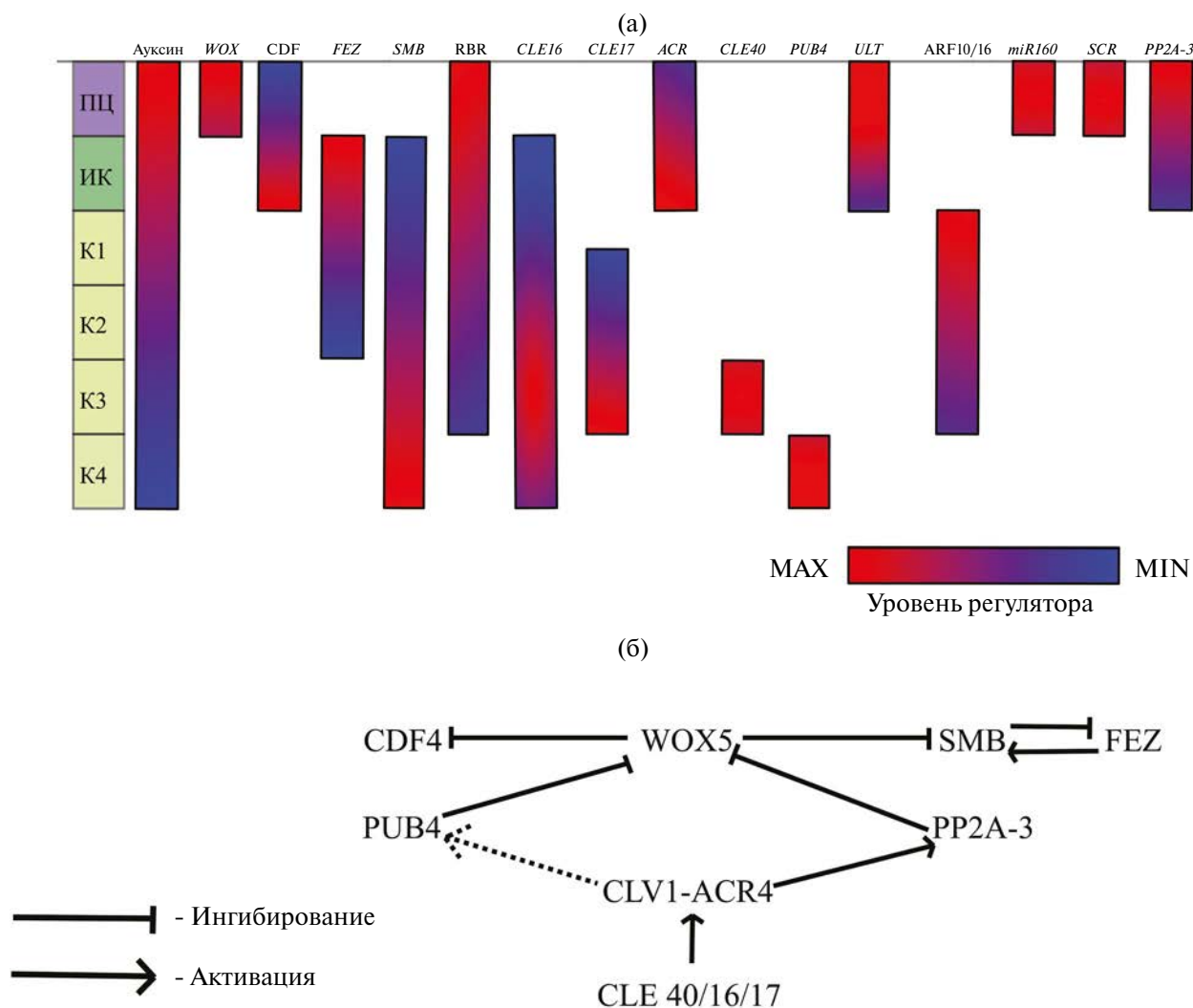


Рис. 3. Регуляция деления и дифференцировки клеток колумеллы: а — распределение регуляторов в корневом чехлике. Красный цвет шкалы соответствует максимальному уровню (MAX), синий — минимальному детектируемому уровню (MIN). Белый цвет отражает отсутствие регулятора в клетках. Каждый регулятор имеет свой максимальный и минимальный уровень. Белки указаны полужирным прямым текстом, транскрипты — курсивом. ПЦ — покоящийся центр, ИК — инициалы колумеллы, K1–K4 — дифференцированные клетки колумеллы; б — генетическое взаимодействие регуляторов делений и дифференцировки клеток. Пунктиром указано гипотетическое взаимодействие (требует дальнейшего изучения).

го гена приводит к преждевременной дифференцировке инициалей колумеллы. У мутантов снижен ауксиновый сигнал в колумелле, однако пока неясно, является ли именно это причиной наблюдаемого фенотипа.

ТФ RBR стимулирует завершение клеточного цикла и дифференцировку в дочерних клетках инициалей колумеллы, работая в рамках регуляторного контура SCR–SHR–RBR [39, 72]. Стоит отметить, что RBR и ARF10/ARF16 регулируют активность инициалей колумеллы независимо от FEZ [5].

Быстрая дифференцировка клеток колумеллы сразу после одного деления стволовой клетки сопровождается уникальным статусом хроматина в этих клетках [73]. У *A. thaliana* клетки колумеллы имеют наиболее метилированную ДНК по сравнению с другими тканями, преимущественно гиперметилированы мобильные элементы. Гиперметилирование осуществляется значимо повышенным количеством малых РНК длиной 24 нуклеотида и транскриптов, кодирующих других участников процесса РНК-направленного метилирования ДНК. При этом в клетках колумеллы не активен ген *DECREASED DNA METHYLATION 1 (DDM1)* и снижено количество транскриптов гистонов, что также указывает на особое состояние эпигенома. О важности эпигенетической регуляции в дифференцировке клеток колумеллы говорит также то, что потеря функции гистон ацетилтрансферазы GENERAL CONTROL NONDEREPRESSIBLE 5 (GCN5) или ассоциированного с ней фактора ALTERATION/DEFICIENCY IN ACTIVATION 2B (ADA2b) снижает число дифференцированных слоев в колумелле [74]. При этом у части мутантов *gcn5* крахмальные зерна, маркирующие дифференцировку, находили в инициалах колумеллы и даже в покоем центре, а у *ada2b* был снижен уровень ауксина в колумелле. Выявлена также роль метаболитов в регуляции дифференцировки клеток колумеллы. Нарушения метаболизма липидов, такие как снижение уровня неспецифических фосфолипидов С или фосфатидилглицерофосфатазы 1, приводят к делениям дифференцирующихся и дифференцированных клеток колумеллы [75; 76]. В случае мутантов по генам неспецифических фосфолипидов С аномальные деления прекращаются при добавлении фосфохолина, продукта активности этих ферментов [75].

Механизмы перехода клеток БКЧ от делений к дифференцировке исследованы в меньшей степени, чем для клеток колумеллы. В БКЧ, как и в колумелле, работает модуль FEZ–SMB [18]. У растений со сверхэкспрессией гена теплового шока *HsfB4 (class B-heat shock factor 4)* наблюдаются дополнительные деления в дочерних клет-

ках инициалей БКЧ и эпиблемы, что приводит к дополнительным слоям в БКЧ и его удлинению до зоны дифференцировки [77]. У мутантов по генам *TORNADO1 (TRN1)* и *TRN2* клетки инициалей БКЧ и эпиблемы делятся аномально, и во многих вертикальных рядах БКЧ развивается вместо эпиблемы [78]. Это подтверждено наличием молекулярного маркера БКЧ и более ранней вакуолизацией клеток в таких рядах по сравнению с клетками эпиблемы, их более толстыми стенками и их гибелью в начале зоны удлинения, что приводит к разрывам в эпиблеме [78]. Увеличение числа инициалей БКЧ и числа слоев БКЧ вызывается также эктопической экспрессией генов *PLT*, в то время как потеря их функции снижает число слоев БКЧ [79]. Активность гена *PLT1* подавляется связыванием с его промотором комплекса ТФ GROWTH-REGULATING FACTOR (GRF) с его кофакторами GRF-INTERACTING FACTORS (GIFs), которые не имеют ДНК связывающего домена [80]. Потеря функции одного из трех GIF кофакторов AN3 увеличивает число слоев в БКЧ.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ УДАЛЕНИЯ КЛЕТОК КОРНЕВОГО ЧЕХЛИКА

Запрограммированная гибель клеток корневого чехлика

Гибель клеток БКЧ в транзитной зоне корня является финальным этапом процесса их дифференцировки [4]. Инициация механизмов гибели клеток БКЧ сопровождается активацией генов аспарагиновой протеазы *PUTATIVE ASPARTIC PROTEINASE A3 (PASP A3)*, нуклеазы *BIFUNCTIONAL NUCLEASE 1 (BFN1)*, рибонуклеазы *RIBONUCLEASE3 (RNS3)*, а также ряда других известных маркеров запрограммированной клеточной гибели [4, 81, 82]. Активация *PASP A3* является первым признаком подготовки клеток БКЧ к гибели [4]. Непосредственно запуск гибели клеток сопровождается резким падением pH цитоплазмы, которое предшествует повышению проницаемости плазмалеммы и разрушению вакуоли. Ферментативная активность BFN1 в отношении нуклеиновых кислот реализуется уже в погибших клетках на стадии автолиза: фермент высвобождается в цитоплазму только после разрушения эндоплазматического ретикулума. Соответственно, у мутантов с потерей функции *bfn1-1* задерживается деградация ядер погибших клеток БКЧ. Примечательно, что в клетках БКЧ на стадии, предшествующей запрограммированной гибели клеток, специфически экспрессируется фосфолипаза PLD ζ 2, гидролизующая мембранные липиды [83]. Также в корневом чехлике перед запрограммированной гибелью клеток активируется ген *ATAO1*, кодирующий медно-аминную оксидазу,

окисляющую путресцин до альдегида, аммиака и пероксида водорода [84].

Запрограммированную гибель клеток БКЧ независимо регулируют ТФ SMB и ANAC087, специфичные для корневого чехлика (лишь небольшое количество ANAC087 обнаруживается также в эпиблеме и клетках сосудов ксилемы) [4, 82]. Эктопическая экспрессия генов, кодирующих эти ТФ, инициирует гибель клеток за пределами чехлика [82]. SMB и ANAC087 регулируют активность генов *BFN1* и *RNS3*. Соответственно, у мутантов *anac087*, как и у *bfn1-1*, нарушена деградация ядерной ДНК в погибших клетках БКЧ [82]. Мутация *smb* ведет к более кардинальным изменениям: гибель клеток задерживается, и БКЧ приобретает увеличенное число клеток и заходит в зону удлинения, что свидетельствует о основополагающей роли этого ТФ в инициации гибели клеток БКЧ [4]. Белок цинковых пальцев ZINC FINGER OF ARABIDOPSIS THALIANA 14 (ZAT14) функционирует как репрессор в генной сети, активируемой SMB и регулирующей запрограммированную гибель клеток в корневом чехлике [85].

Недавно было показано, что продолжительность жизни слушающихся клеток колумеллы *A. thaliana* также регулируется путем их программируемой гибели, запуск которой контролируют ТФ ANAC087 и ANAC046 [82].

Слушивание дистального слоя клеток корневого чехлика

Принципиальным событием в слушивании дистального слоя клеток корневого чехлика является реорганизация клеточных стенок [86]. ТФ SMB, BEARSKIN 1 (BRN1), BRN2 и NIN-LIKE PROTEIN 7 (NLP7) регулируют созревание клеток корневого чехлика и модификацию их клеточных стенок [17, 87, 88]. *BRN1* и *BRN2* активируются в клетках, расположенных на поверхности корневого чехлика; в БКЧ их экспрессия зависит от ТФ SMB [87]. BRN1 и BRN2 активируют ген пектиназы *ROOT CAP POLYGALACTURONASE (RCPG)*. Функционирование этого фермента способствует отделению клеток.

Как мы упоминали выше, характерной особенностью Brassicaceae, включая *A. thaliana*, является слушивание пограничных клеток корневого чехлика единым слоем с сохранением контактов между ними [21]. Такой характер отделения клеток обеспечивает ТФ NLP7, ключевой регулятор передачи нитратного сигнала [88]. Он инициируется низкими значениями pH и активен в пограничных клетках. У проростков *A. thaliana* с мутацией *npl7* слушиваются отдельные клетки, и мутантный фенотип зависит от экспрессии гена *CELLULOSE 5 (CEL5)*.

Помимо этого, у мутантов активируются гены других ферментов, активных в отношении полисахаридов клеточных стенок (в частности, ксиланоглюкан-специфичные гликозил-гидролазы и пектин-лиазы), а также ТФ SMB, BRN1 и BRN2.

Аутофагия как процесс деградации клеточных компонентов через формирование аутофагосом и аутофагического потока к лизосомам и вакуолям, где происходит их лизис, значительно усиливается перед запрограммированной гибелью клеток БКЧ и слушиванием клеток в колумелле [15, 89]. Этому способствует активация *AUTOPHAGY GENE 2 (ATG2)*, *ATG5* и *ATG7* [89]. В колумелле мутация *ATG5* приводит к слушиванию отдельных клеток вместо целого слоя и задержке их гибели [15, 89].

СИНХРОНИЗАЦИЯ ДЕЛЕНИЯ ИНИЦИАЛЕЙ И СЛУШИВАНИЯ ДИСТАЛЬНОГО СЛОЯ КЛЕТОК

В корневом чехлике деление инициалей компенсирует слушивание его последнего слоя, и координация этих процессов градиентом ауксина в значительной степени обеспечивает постоянный размер органа [12, 14]. Так, ТФ NLP7 оказывает влияние на ауксиновый сигнал в клетках внешнего слоя корневого чехлика в ответ на дефицит азота [80]. Мутация *nlp7* усиливает ауксиновый сигнал во внешнем слое клеток колумеллы за счет изменения транспорта ауксина, что сопровождается снижением митотической активности и дифференцировкой ствольных клеток колумеллы. Более того, у мутанта снижается экспрессия *WOX5*. Это подтверждает роль ауксина в синхронизации делений и слушивания.

Сигнальный пептид IDA-LIKE 1 (IDL1) и его рецептор HAESA-LIKE 2 (HSL2), по-видимому, координируют динамику слушивания и образования новых слоев дочерних клеток инициалей [14]. *IDL1* активен преимущественно в двух последних (периферических) слоях колумеллы, которые будут последовательно слушиваться друг за другом. *HSL2*, наоборот, экспрессируется в верхних слоях колумеллы и в молодых клетках БКЧ. Повышенная экспрессия *IDL1* увеличивает частоту слушивания слоев за счет сокращения интервала между слушиванием слоев вплоть до отделения двух слоев одновременно. При этом, если *IDL1* сверхэкспрессируется в *hsl2* мутанте, удаление клеток нарушается расщеплением слушающегося слоя на границе между колумеллой и БКЧ или, наоборот, отсутствием слушивания в районе БКЧ.

Обобщая все сказанное выше, обновление клеток корневого чехлика происходит путем регулярных делений инициалей, дочерние клетки

которых дифференцируются в клетки колумеллы и БКЧ, при этом старые дифференцированные клетки удаляются путем запрограммированной гибели (клетки БКЧ выше покоящегося центра) или слущивания в почву (клетки БКЧ ниже покоящегося центра и клетки колумеллы). У *A. thaliana* процессы поступления и удаления клеток достаточно строго синхронизированы, что позволяет поддерживать постоянный размер корневого чехлика. В настоящее время описаны гормональные регуляторы этих процессов, ключевым среди которых является ауксин. Определен ряд генетических регуляторов, некоторые из которых объединяются в регуляторные контуры. То, что одни и те же гены зачастую контролируют разные стадии обновления корневого чехлика (например, *SMB*), говорит об их прямой или косвенной вовлеченности в координацию процессов деления и удаления клеток. Градиент ауксина в колумелле, вероятнее всего, является основополагающим механизмом синхронизации этих двух процессов. Однако явные связи между ауксином и другими потенциальными координаторами на сегодняшний день не установлены. Таким образом, реконструкция целостной динамической сети регуляции обновления корневого чехлика — вопрос будущего.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 20-14-00140.

Авторы искренне благодарны В.В. Лавреxe за продуктивное обсуждение статьи.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ganesh A., Shukla V., Mohapatra A., George A. P., Bhukya D.P.N., Das K.K., Kola V.S.R., Suresh A., Ramireddy E. Root cap to soil interface: a driving force toward plant adaptation and development // *Plant Cell Physiol.* 2022. V. 638. P. 1038. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcac078>
2. Arnaud C., Bonnot C., Desnos T., Nussaume L. The root cap at the forefront // *C. R. Biol.* 2010. V. 333. P. 335. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2010.01.011>
3. Dolan L., Janmaat K., Willemsen V., Linstead P., Poethig S., Roberts K., Scheres B. Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root // *Development.* 1993. V. 119. P. 71. <https://doi.org/10.1242/dev.119.1.71>
4. Fendrych M., Hautegeem T.V., Durme M.V., Oliveira-Carrillo Y., Huysmans M., Karimi M., Lippens S., Guérin C.J., Krebs M., Schumacher K., Nowack M.K. Programmed cell death controlled by ANAC033/SOMBRERO determines root cap organ size in *Arabidopsis* // *Curr. Biol.* 2014. V. 24. P. 931. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2014.03.025>
5. Bennett T., van den Toorn A., Willemsen V., Scheres B. Precise control of plant stem cell activity through parallel regulatory inputs // *Development.* 2014. V. 141. P. 4055. <https://doi.org/10.1242/DEV.110148>
6. Sack F.D., Kiss J.Z. Root cap structure in wild type and in a starchless mutant of *Arabidopsis* // *Am. J. Bot.* 1989. V. 76. P. 454. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1989.tb11334.x>
7. Iijima M., Morita S., Barlow P.W. Structure and function of the root cap // *Plant Prod. Sci.* 2008. V. 11. P. 17. <https://doi.org/10.1626/ppp.11.17>
8. Maeda K., Kunieda T., Tamura K., Hatano K., Hara-Nishimura I., Shimada T. Identification of periplasmic root-cap mucilage in developing columella cells of *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell Physiol.* 2019. V. 60. P. 1296. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz047>
9. Wenzel C.L., Rost T.L. Cell division patterns of the protoderm and root cap in the “closed” root apical meristem of *Arabidopsis thaliana* // *Protoplasma.* 2001. V. 218. P. 203. <https://doi.org/10.1007/BF01306609>
10. Campilho A., Garcia B., Toorn H.V., Wijk H.V., Campilho A., Scheres B. Time-lapse analysis of stem-cell divisions in the *Arabidopsis thaliana* root meristem // *Plant J.* 2006. V. 48. P. 619. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02892.x>
11. Kumpf R.P., Nowack M.K. The root cap: a short story of life and death // *J. Exp. Bot.* 2015. V. 66. P. 5651. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERV295>
12. Dubreuil C., Jin X., Grönlund A., Fischer U. A Local auxin gradient regulates root cap self-renewal and size homeostasis // *Curr. Biol.* 2018. V. 28. P. 2581. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2018.05.090>
13. Wein A., Le Gac A.L., Laux T. Stem cell ageing of the root apical meristem of *Arabidopsis thaliana* // *Mech. Ageing Dev.* 2020. V. 190. P. 111313. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111313>
14. Shi C.-L., von Wangenheim D., Herrmann U., Wildhagen M., Kulik I., Kopf A., Ishida T., Olsson V., Anker M.K., Albert M., Butenko M.A., Felix G., Sawa S., Claassen M., Friml J., Aalen R.B. The dynamics of root cap sloughing in *Arabidopsis* is regulated by peptide signalling // *Nat. Plants.* 2018. V. 4. P. 596. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0212-z>
15. Goh T., Sakamoto K., Wang P., Kozono S., Ueno K., Miyashima S., Toyokura K., Fukaki H., Kang B.-H., Nakajima K. Autophagy promotes organelle clearance and organized cell separation of living root cap cells in *Arabidopsis thaliana* // *Development.* 2022. V. 149. <https://doi.org/10.1242/dev.200593>

16. Xuan W., Band L. R., Kumpf R.P., Van Damme D., Parizot B., De Rop G., Opdenacker D., Möller B. K., Skorzinski N., Njo M.F., De Rybel B., Audenaert D., Nowack M.K., Vanneste S., Beeckman T. Cyclic programmed cell death stimulates hormone signaling and root development in Arabidopsis // Science. 2016. V. 351. P. 384.
<https://doi.org/10.1126/science.aad2776>
17. Bennett T., van den Toorn A., Sanchez-Perez G.F., Campilho A., Willemsen V., Snel B., Scheres B. SOMBRERO, BEARSKIN1, and BEARSKIN2 regulate root cap maturation in Arabidopsis // The Plant Cell. 2010. V. 22. P. 640.
<https://doi.org/10.1105/tpc.109.072272>
18. Willemsen V., Bauch M., Bennett T., Campilho A., Wolkenfelt H., Xu J., Haseloff J., Scheres B. The NAC domain transcription factors FEZ and SOMBRERO control the orientation of cell division plane in Arabidopsis root stem cells // Dev. Cell. 2008. V. 15. P. 913.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.09.019>
19. Hawes M.C., Brigham L.A., Wen F., Woo H.H., Zhu Y. Function of root border cells in plant health: pioneers in the rhizosphere // Annu. Rev. Phytopathol. 1998. V. 36. P. 311.
<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.311>
20. Hawes M.C., Gunawardena U., Miyasaka S., Zhao X. The role of root border cells in plant defense // Trends Plant Sci. 2000. V. 5. P. 128.
[https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(00\)01556-9](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(00)01556-9)
21. Vicré M., Santaella C., Blanchet S., Gateau A., Driouich, A. Root border-like cells of Arabidopsis. Microscopical characterization and role in the interaction with Rhizobacteria // Plant Physiol. 2005. V. 138. P. 998.
<https://doi.org/10.1104/pp.104.051813>
22. Hawes M. C. Bengough G., Cassab G., Ponce G. Root caps and Rhizosphere // J. Plant Growth Regul. 2003. V. 21. P. 352.
<https://doi.org/10.1007/s00344-002-0035-y>
23. Driouich A., Durand C., Vicré-Gibouin M. Formation and separation of root border cells // Trends Plant Sci. 2007. V. 12. P. 14.
24. Ding Z., Friml J. Auxin regulates distal stem cell differentiation in Arabidopsis roots // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 12046.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1000672107>
25. Hong J.H., Chu H., Zhang C., Ghosh D., Gong X., Xu L. A quantitative analysis of stem cell homeostasis in the Arabidopsis columella root cap // Front. Plant Sci. 2015. V. 6. P. 206.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00206>
26. Zazimalová E., Krecek P., Skůpa P., Hoyerová K., Petrůšek J. Polar transport of the plant hormone auxin – the role of PIN-FORMED (PIN) proteins // Cell. Mol. Life Sci. 2007. V. 64. P. 1621.
<https://doi.org/10.1007/s00018-007-6566-4>
27. Křeček P., Skůpa P., Libus J., Naramoto S., Tejos R., Friml J., Zazimalová E. The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters // Genome Biol. 2009. V. 10. P. 249.
<https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-12-249>
28. Grieneisen V.A., Xu J., Marée A.F., Hogeweg P., Scheres B. Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth // Nature. 2007. V. 449. P. 1008.
<https://doi.org/10.1038/nature06215>
29. Mironova V.V., Omelyanchuk N.A., Yosiphon G., Fadeev S.I., Kolchanov N.A., Mjolsness E., Likhoshvai V.A. A plausible mechanism for auxin patterning along the developing root // BMC Syst. Biol. 2010. V. 4. P. 98.
<https://doi.org/10.1186/1752-0509-4-98>
30. Swarup R., Friml J., Marchant A., Ljung K., Sandberg G., Palme K., Bennett, M. Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex // Genes Dev. 2001. V. 15. P. 2648.
<https://doi.org/10.1101/gad.210501>
31. Band L.R., Wells D.M., Fozard J.A., Ghetiu T., French A.P., Pound M.P., Wilson M.H., Yu L., Li W., Hijazi H.I., Oh J., Pearce S.P., Perez-Amador M.A., Yun J., Kramer E. et al. Systems analysis of auxin transport in the Arabidopsis root apex // Plant Cell. 2014. V. 26. P. 862.
<https://doi.org/10.1105/tpc.113.119495>
32. Tian H., Niu T., Yu Q., Quan T., Ding Z. Auxin gradient is crucial for the maintenance of root distal stem cell identity in Arabidopsis // Plant Signal. Behav. 2013. V. 8: e26429.
<https://doi.org/10.4161/psb.26429>
33. Martin-Arevalillo R., Vernoux T. Decoding the auxin matrix: auxin biology through the eye of the computer // Annu. Rev. Plant Biol. 2023. V. 74. P. 387.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-102720-033523>
34. Zhang Q., Gong M., Xu X., Li H., Deng W. Roles of auxin in the growth, development, and stress tolerance of horticultural plants // Cells. 2022. V. 11. P. 2761.
<https://doi.org/10.3390/cells11172761>
35. Caumon H., Vernoux T. A matter of time: auxin signaling dynamics and the regulation of auxin responses during plant development // J. Exp. Bot. 2023. V. 74. P. 3887.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erad132>
36. Tian H., Wabnik K., Niu T., Li H., Yu Q., Pollmann S., Vanneste S., Govaerts W., Rolcik J., Geisler M., Friml J., Ding Z. WOX5-IAA17 feedback circuit-mediated cellular auxin response is crucial for the patterning of root stem cell niches in Arabidopsis // Mol. Plant. 2014. V. 7. P. 277.
<https://doi.org/10.1093/mp/sst118>
37. Aida M., Beis D., Heidstra R., Willemsen V., Blilou I., Galinha C., Nussaume L., Noh Y. S., Amasino R., Scheres B. The PLETHORA genes mediate patterning of the Arabidopsis root stem cell niche // Cell. 2004. V. 119. P. 109.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.09.018>

38. Blilou I., Xu J., Wildwater M., Willemsen V., Paponov I., Friml J., Heidstra R., Aida M., Palme K., Scheres B. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots // *Nature*. 2005. V. 433. P. 39.
<https://doi.org/10.1038/nature03184>
39. Cruz-Ramírez A., Díaz-Triviño S., Blilou I., Grieneisen V.A., Sozzani R., Zamioudis C., Miskolczi P., Nieuwland J., Benjamins R., Dhonukshe P., Caballero-Pérez J., Horvath B., Long Y., Mähönen A.P., Zhang H. et al. A bistable circuit involving SCARECROW-RETINOBLASTOMA integrates cues to inform asymmetric stem cell division // *Cell*. 2012. V. 150. P. 1002.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.017>
40. Yang W., Cortijo S., Korsbo N., Roszak P., Schiessl K., Gurzadyan A., Wightman R., Jönsson H., Meyerowitz E. Molecular mechanism of cytokinin-activated cell division in *Arabidopsis* // *Science*. 2021. V. 371. P. 1350. <https://doi.org/10.1126/science.abe2305>
41. Svolacchia N., Sabatini S. Cytokinins // *Curr. Biol*. 2023. V. 33. P. 10.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.11.022>
42. Antoniadis I., Plačková L., Simonovik B., Doležal K., Turnbull C., Ljung K., Novák O. Cell-type-specific cytokinin distribution within the *Arabidopsis* primary root apex // *Plant Cell*. 2015. V. 27. P. 1955.
<https://doi.org/10.1105/tpc.15.00176>
43. Stolz A., Riefler M., Lomin S. N., Achazi K., Romanov G.A., Schmülling, T. The specificity of cytokinin signalling in *Arabidopsis thaliana* is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors // *Plant J*. 2011. V. 67. P. 157.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04584.x>
44. Tsilimigka F., Poullos S., Mallioura A., Vlachonasiou K. ADA2b and GCN5 affect cytokinin signaling by modulating histone acetylation and gene expression during root growth of *Arabidopsis thaliana* // *Plants*. 2022. V. 11. P. 1335.
<https://doi.org/10.3390/plants11101335>
45. Antoniadis I., Novák O., Gelová Z., Johnson A., Plíhal ., Simerský R., Mik V., Vain T., Mateo-Bonmatí E., Karady M., Pernisova M., Plačková L., Opasathian K., Hejácíko J., Friml J. et al. Cell-surface receptors enable perception of extracellular cytokinins // *Nat. Commun*. 2020. V. 11. P. 4284.
<https://doi.org/10.1101/726125>
46. Di Mambro R., Svolacchia N., Ioio R. D., Pierdonati E., Salvi E., Pedrazzini E., Vitale A., Perilli S., Sozzani R., Benfey P. N., Busch W., Costantino P., Sabatini S. The lateral root cap acts as an auxin sink that controls meristem size // *Curr. Biol*. 2019. V. 29. P. 1199.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.02.022>
47. Wang Z., Rong D., Chen D., Xiao Y., Liu R., Wu S., Yamamuro C. Salicylic acid promotes quiescent center cell division through ROS accumulation and down-regulation of PLT1, PLT2, and WOX5 // *J. Integr. Plant Biol*. 2021. V. 63. P. 583.
<https://doi.org/10.1111/jipb.13020>
48. Pasternak T., Groot E.P., Kazantsev F.V., Teale W., Omelyanchuk N., Kovrizhnykh V., Palme K., Mironova V.V. Salicylic acid affects root meristem patterning via auxin distribution in a concentration-dependent manner // *Plant Physiol*. 2019. V. 180. P. 1725.
<https://doi.org/10.1104/pp.19.00130>
49. Ke M., Ma Z., Wang D., Sun Y., Wen C., Huang D., Chen Z., Yang L., Tan S., Li R., Friml J., Miao Y., Chen X. Salicylic acid regulates PIN2 auxin transporter hyperclustering and root gravitropic growth via Remorin-dependent lipid nanodomain organisation in *Arabidopsis thaliana* // *New Phytol*. 2021. V. 229. P. 963.
<https://doi.org/10.1111/nph.16915>
50. Armengot L., Marqués-Bueno M.M., Soria-García A., Müller M., Munné-Bosch S., Martínez M.C. Functional interplay between protein kinase CK 2 and salicylic acid sustains PIN transcriptional expression and root development // *Plant J*. 2014. V. 78. P. 411.
<https://doi.org/10.1111/tpj.12481>
51. Gonzalez-García M.P., Vilarrasa-Blasi J., Zhiponova M., Divol F., Mora-García S., Russinova E., Caño-Delgado A.I. Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in *Arabidopsis* roots // *Development*. 2011. V. 138. P. 849.
<https://doi.org/10.1242/dev.057331>
52. Lee H.S., Kim Y., Pham G., Kim J.W., Song J.H., Lee Y., Hwang Y.-S., Roux S.J., Kim S.H. Brassinazole resistant 1 (BZR1)-dependent brassinosteroid signalling pathway leads to ectopic activation of quiescent cell division and suppresses columella stem cell differentiation // *J. Exp. Bot*. 2015. V. 66. P. 4835.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erv316>
53. Wei Z., Li J. Brassinosteroids regulate root growth, development, and symbiosis // *Mol. Plant*. 2016. V. 9. P. 86.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.12.00>
54. Chen Q., Sun J., Zhai Q., Zhou W., Qi L., Xu L., Wang B., Chen R., Jiang H., Qi J., Li X., Palme K., Li C. The basic helix-loop-helix transcription factor MYC2 directly represses PLETHORA expression during jasmonate-mediated modulation of the root stem cell niche in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2011. V. 23. P. 3335.
<https://doi.org/10.1105/tpc.111.089870>
55. Christmann A., Hoffmann T., Teplova I., Grill E., Muller A. Generation of active pools of abscisic acid revealed by in vivo imaging of water-stressed *Arabidopsis* // *Plant Physiol*. 2005. V. 137. P. 209.
<https://doi.org/10.1104/pp.104.053082>
56. Zhang H., Han W., De Smet I., Talboys P., Loya R., Hassan A., Rong H., Jürgens G., Knox J.P., Wang M.H. ABA promotes quiescence of the quiescent centre and suppresses stem cell differentiation in the *Arabidopsis* primary root meristem // *Plant J*. 2010. V. 64. P. 764.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04367.x>
57. Sarkar A.K., Luijten M., Miyashima S., Lenhard M., Hashimoto T., Nakajima K., Scheres B., Heidstra R., Laux T. Conserved factors regulate signalling in *Ara-*

- bidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers // Nature. 2007. V. 446. P. 811.
<https://doi.org/10.1038/nature05703>
58. Hardtke C.S., Berleth T. The Arabidopsis gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development // EMBO J. 1998. V. 17. P. 1405.
<https://doi.org/10.1093/emboj/17.5.1405>
 59. Tsuchisaka A., Theologis A. Unique and overlapping expression patterns among the Arabidopsis 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members // Plant Physiol. 2004. V. 136. P. 2982.
<https://doi.org/10.1104/pp.104.049999>
 60. Swarup R., Perry P., Hagenbeek D., Van Der Straeten D., Beemster G.T., Sandberg G., Bhalerao R., Ljung K., Bennett M. J. Ethylene upregulates auxin biosynthesis in Arabidopsis seedlings to enhance inhibition of root cell elongation // Plant Cell. 2007. V. 19. P. 2186.
<https://doi.org/10.1105/tpc.107.052100>
 61. Li G., Zhu C., Gan L., Ng D., Xia K. GA 3 enhances root responsiveness to exogenous IAA by modulating auxin transport and signalling in Arabidopsis // Plant Cell Rep. 2015. V. 34. P. 483.
<https://doi.org/10.1007/s00299-014-1728-y>
 62. Forzani C., Aichinger E., Sornay E., Willemsen V., Laux T., Dewitte W., Murray J.A. WOX5 suppresses CYCLIN D activity to establish quiescence at the center of the root stem cell niche // Curr. Biol. 2014. V. 24. P. 1939.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.07.019>
 63. Berckmans B., Kirschner G., Gerlitz N., Stadler R., Simon R. CLE40 signaling regulates root stem cell fate // Plant Physiol. 2020 V. 182. P. 1776.
<https://doi.org/10.1104/pp.19.00914>
 64. Pi L., Aichinger E., van der Graaff E., Llavata-Peris C.I., Weijers D., Hennig L., Groot E., Laux T. Organizer-derived WOX5 signal maintains root columella stem cells through chromatin-mediated repression of CDF4 expression // Dev. Cell. 2015. V. 33. P. 576.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.04.024>
 65. Stahl Y., Wink R.H., Ingram G.C., Simon R. A signaling module controlling the stem cell niche in Arabidopsis root meristems // Curr. Biol. 2009. V. 19. P. 909.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.03.060>
 66. Zhang L., Yang Y., Mu C., Liu M., Ishida T., Sawa S., Zhu Y., Pi L. Control of root stem cell differentiation and lateral root emergence by CLE16/17 peptides in Arabidopsis // Front. Plant Sci. 2022. V. 13. P. 869888.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.869888>
 67. Stahl Y., Grabowski S., Bleckmann A., Kühnemuth R., Weidtkamp-Peters S., Pinto K.G., Kirschner G.K., Schmid J.B., Wink R.H., Hülsewede A., Felekyan S., Seidel C.A., Simon R. Moderation of Arabidopsis root stemness by CLAVATA1 and ARABIDOPSIS CRINKLY4 receptor kinase complexes // Curr. Biol. 2013. V. 23. P. 362.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.01.045>
 68. Yue K., Sandal P., Williams E. L., Murphy E., Stes E., Nikonorova N., Ramakrishna P., Czyzewicz N., Montero-Morales L., Kumpf R., Lin Z., van de Cotte B., Iqbal M., Van Bel M., Van De Slijke E. et al. PP2A-3 interacts with ACR4 and regulates formative cell division in the Arabidopsis root // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. P. 1447.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1525122113>
 69. Kinoshita A., ten Hove C. A., Tabata R., Yamada M., Shimizu N., Ishida T., Yamaguchi K., Shigenobu S., Takebayashi Y., Iuchi S., Kobayashi M., Kurata T., Wada T., Seo M., Hasebe M. A plant U-box protein, PUB4, regulates asymmetric cell division and cell proliferation in the root meristem // Development. 2015. V. 142. P. 444.
<https://doi.org/10.1242/dev.113167>
 70. Wang J.W., Wang L.J., Mao Y.B., Cai W.J., Xue H.W., Chen X.Y. Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in Arabidopsis // Plant Cell. 2005. V. 17. P. 2204.
<https://doi.org/10.1105/TPC.105.033076>
 71. Ornelas-Ayala D., Vega-León R., Petrone-Mendoza E., Garay-Arroyo A., García-Ponce B., Álvarez-Buylla E.R., Sanchez M.D.L.P. ULTRAPETALA1 maintains Arabidopsis root stem cell niche independently of ARABIDOPSIS TRITHORAX1 // New Phytol. 2020. V. 225. P. 1261.
<https://doi.org/10.1111/nph.16213>
 72. Wildwater M., Campilho A., Perez-Perez J.M., Heidsstra R., Blilou I., Korthout H., Chatterjee J., Mariconiti L., Gruissem W., Scheres B. The RETINOBLASTOMA-RELATED gene regulates stem cell maintenance in Arabidopsis roots // Cell. 2005. V. 123. P. 1337.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.042>
 73. Kawakatsu T., Stuart T., Valdes M., Breakfield N., Schmitz R.J., Nery J.R., Mark A.U. Han X. Benfey P.N., Ecker J.R. Unique cell-type-specific patterns of DNA methylation in the root meristem // Nat. Plants. 2016. V. 2. P. 16058.
<https://doi.org/10.1038/nplants.2016.58>
 74. Kornet N., Scheres B. Members of the GCN5 histone acetyltransferase complex regulate PLETHORA-mediated root stem cell niche maintenance and transit amplifying cell proliferation in Arabidopsis // Plant Cell. 2009. V. 21. P. 1070.
<https://doi.org/10.1105/tpc.108.065300>
 75. Ngo A.H., Kanehara K., Nakamura Y. Non-specific phospholipases C, NPC2 and NPC6, are required for root growth in Arabidopsis // Plant J. 2019. V. 100. P. 825.
<https://doi.org/10.1111/tpj.14494>
 76. Lin Y.C., Kobayashi K., Wada H., Nakamura Y. Phosphatidylglycerophosphate phosphatase is required for root growth in Arabidopsis // Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids. 2018. V. 1863. P. 563.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.02.007>
 77. Begum T., Reuter R., Schöffl F. Overexpression of AtHsfB4 induces specific effects on root development of Arabidopsis // Mech. Dev. 2013. V. 130. P. 54.
<https://doi.org/10.1016/j.mod.2012.05.008>

78. *Cnops G., Wang X., Linstead P., Montagu M.V., Lijsebettens M.V., Dolan L.* Tornado1 and tornado2 are required for the specification of radial and circumferential pattern in the Arabidopsis root // *Development*. 2000. V. 127. P. 3385.
<https://doi.org/10.1242/dev.127.15.3385>
79. *Galinha C., Hofhuis H., Luijten M., Willemsen V., Blilou I., Heidstra R., Scheres B.* PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development // *Nature*. 2007. V. 449. P. 1053.
<https://doi.org/10.1038/nature06206>
80. *Ercoli M.F., Ferela A., Debernardi J.M., Perrone A.P., Rodriguez R.E., Palatnik J.F.* GIF transcriptional co-regulators control root meristem homeostasis // *Plant Cell*. 2018. V. 30. P. 347.
<https://doi.org/10.1105/tpc.17.00856>
81. *Olvera-Carrillo Y., Van Bel M., Van Hautegeem T., Fendrych M., Huysmans M., Simaskova M., van Durme M., Buscaill P., Rivas S., Coll N.S., Coppens F., Maere S., Nowack M.K.* A Conserved core of programmed cell death indicator genes discriminates developmentally and environmentally induced programmed cell death in plants // *Plant Physiol.* 2015. V. 169. P. 2684.
<https://doi.org/10.1104/pp.15.00769>
82. *Huysmans M., Buono R.A., Skorzinski N., Radio M.C., De Winter F., Parizot B., Mertens J., Karimi M., Fendrych M., Nowack M.K.* NAC transcription factors ANAC087 and ANAC046 control distinct aspects of programmed cell death in the Arabidopsis columella and lateral root cap // *Plant Cell*. 2018. V. 30. P. 2197.
<https://doi.org/10.1105/tpc.18.00293>
83. *Shimamura R., Ohashi Y., Taniguchi Y.Y., Kato M., Tsuge T., Aoyama T.* Arabidopsis PLD ζ 1 and PLD ζ 2 localize to post-Golgi membrane compartments in a partially overlapping manner // *Plant Mol. Biol.* 2022. V. 108. P. 31.
<https://doi.org/10.1007/s11103-021-01205-0>
84. *Møller S.G., McPherson M.J.* Developmental expression and biochemical analysis of the Arabidopsis *atao1* gene encoding an H₂O₂-generating diamine oxidase // *Plant J.* 1998. V. 13. P. 781.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.1998.00080.x>
85. *Feng Q., Cubría-Radio M., Vavrdová T., De Winter F., Schilling N., Huysmans M., Nanda A.K., Melnyk C.W., Nowack M.K.* Repressive ZINC FINGER OF ARABIDOPSIS THALIANA proteins promote programmed cell death in the Arabidopsis columella root cap // *Plant Physiol.* 2023. V. 192. P. 1151.
<https://doi.org/10.1093/plphys/kiad130>
86. *Durand C., Vitré-Gibouin M., Follet-Gueye M.L., Duponchel L., Moreau M., Lerouge P., Driouich A.* The organization pattern of root border-like cells of Arabidopsis is dependent on cell wall homogalacturonan // *Plant Physiol.* 2009. V. 150. P. 1411.
<https://doi.org/10.1104/pp.109.136382>
87. *Kamiya M., Higashio S.-Y., Isomoto A., Kim J.-M., Seki M., Miyashima S., Nakajima K.* Control of root cap maturation and cell detachment by BEARSKIN transcription factors in Arabidopsis // *Development*. 2016. V. 143. P. 4063.
<https://doi.org/10.1242/dev.142331>
88. *Karve R., Suárez-Román F., Iyer-Pascuzzi A.S.* The transcription factor NIN-LIKE PROTEIN7 controls border-like cell release // *Plant Physiol.* 2016. V. 171. P. 2101.
<https://doi.org/10.1104/pp.16.00453>
89. *Feng Q., Rycke R. D., Dagdas Y., Nowack M.K.* Autophagy promotes programmed cell death and corpse clearance in specific cell types of the Arabidopsis root cap // *Curr. Biol.* 2022. V. 32. P. 4548.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.03.053>

УДК 581.1

N-ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ

© 2024 г. И. А. Ларская^{а,*}, Е. О. Федина^а, П. В. Микшина^а, Т. А. Горшкова^{а,б}^аКазанский институт биохимии и биофизики — обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия^бИнститут физиологии Федерального исследовательского центра Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар, Россия

*e-mail: pzl@mail.ru

Поступила в редакцию 21.08.2023 г.

После доработки 03.10.2023 г.

Принята к публикации 06.10.2023 г.

N-гликозилирование является одной из самых распространенных и наиболее сложной среди посттрансляционных модификаций белков, которая играет ключевую роль в их укладке, контроле качества и деградации, а также оказывает влияние на активность, транспорт, локализацию и взаимодействие с другими белками. Более того, N-гликозилирование модулирует многие важные биологические процессы, включая рост, развитие, морфогенез, и участвует в процессах передачи стрессовых сигналов. При этом если роль N-гликозилирования в целом и функции отдельных N-гликанов на клетках млекопитающих хорошо изучены, исследования этого процесса в растениях значительно отстают. В обзоре обобщена имеющаяся информация о процессе N-гликозилирования белков, описан путь биосинтеза и функции различных N-гликанов в растениях в контексте роста, развития и влияния внешних факторов. Делается акцент на основных моментах, которые необходимо учитывать при исследовании этого процесса в растениях и обсуждаются возможности практического использования полученных знаний для гликоинжиниринга растительных белков.

Ключевые слова: аппарат Гольджи, мутанты, растения, рост, стресс, ферменты процессинга N-гликанов, эндоплазматический ретикулум, N-гликозилирование

DOI: 10.31857/S0015330324020036, EDN: OBVBUR

ВВЕДЕНИЕ

Функциональные особенности белков в значительной степени определяются ко-/посттрансляционными модификациями, влияющими на их активность, транспорт, локализацию, взаимодействие с другими белками, что в свою очередь, находит отражение в изменении фенотипа организмов и в их способности адаптироваться к условиям окружающей среды [1, 2]. Регулярно пополняемый список включает более двухсот различных посттрансляционных модификаций белков растений, которые могут быть как широко распространенными, так и редкими, вплоть до уникальных [3]. Считается, что ферментативное гликозилирование (присоединение углеводных фрагментов к молекуле белка) является одной из самых распространенных и при этом наиболее сложной из всех посттрансляционных модификаций. Связанные с белками гликаны представляют собой разнообразные олигосахаридные структуры, синтез которых обеспечивается сложным ферментативным механизмом, опосредуемым, по меньшей мере, более чем 250 генами, охарактеризованными на сегодняшний день [4, 5]. Эта модификация

включает O-гликозилирование и N-гликозилирование, в зависимости от типа связи и места присоединения гликана [3]. N-гликаны связываются с цепью белка через амидную связь с остатком аспарагина в мотиве Asn-X-Ser/Thr, где X может быть любой аминокислотой, кроме пролина. Эта аминокислотная последовательность в молекуле белка, по которой происходит присоединение гликанов при N-гликозилировании, получила название секвона. Было показано, что аминокислота в положении X, а также аминокислота, следующая за мотивом Asn-X-Ser/Thr, важна для эффективного N-гликозилирования [6, 7]. O-гликаны в растениях связываются с белками преимущественно через гидроксильную группу гидроксипролина, серина и реже — треонина (рис. 1).

N-связанные гликаны играют весомую роль в функционировании растительных организмов и считаются необходимыми для изменения физико-химических свойств и определения биологических функций белков [5]. Они участвуют в фолдинге белков и регуляции контроля качества в эндоплазматическом ретикулуме, стабилизируют их от денатурации и протеоли-

ЭТАПЫ N-ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ. ТИПЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ N-ГЛИКАНОВ

N-гликозилирование белков — это высококонсервативный процесс, основанный на последовательных и хорошо скоординированных реакциях, которые, в основном, имеют место в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи [11, 20]. Поэтапная сборка прикрепляемого к белку гликана инициируется на цитоплазматической и продолжается на люменальной поверхности мембраны эндоплазматического ретикулума с помощью множества специфических гликозилтрансфераз (ALG — asparagine-linked glycosylation) (рис. 2а), что приводит к образованию олигосахаридного предшественника, связанного с долихолфосфатом ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$). Собственно, процесс N-гликозилирования белков начинается с переноса этого олигосахаридного предшественника с липидного носителя на сайты N-гликозилирования синтезируемых белков с помощью олигосахарилтрансферазного комплекса (OST), распознающего кон-

кретную аминокислотную последовательность (Asn-X-Ser/Thr , где X — любая аминокислота, кроме пролина). В эндоплазматическом ретикулуме N-гликаны последовательно обрезаются α -глюкозидазами I и II до моноглюкозидного состояния, что позволяет ему вступить в цикл контроля качества ЭПР, где при связывании с шаперонами эндоплазматического ретикулума — кальнексином (CNX) и кальретикулином (CRT) происходит сворачивание белковой молекулы и распознавание несвернутых или неправильно свернутых белков, которые могут повторно входить в цикл для рефолдинга (рис. 2а). Если это не удастся, белки с неправильной укладкой перемещаются для эндоплазматический ретикулум-ассоциированной деградации (ERAD — Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation). У правильно свернутого гликопротеина маннозидаза (MNS3), локализованная в эндоплазматическом ретикулуме, удаляет один остаток маннозы, чтобы получить структуру $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, способную транспортироваться в аппарат Гольджи. Эта часть био-

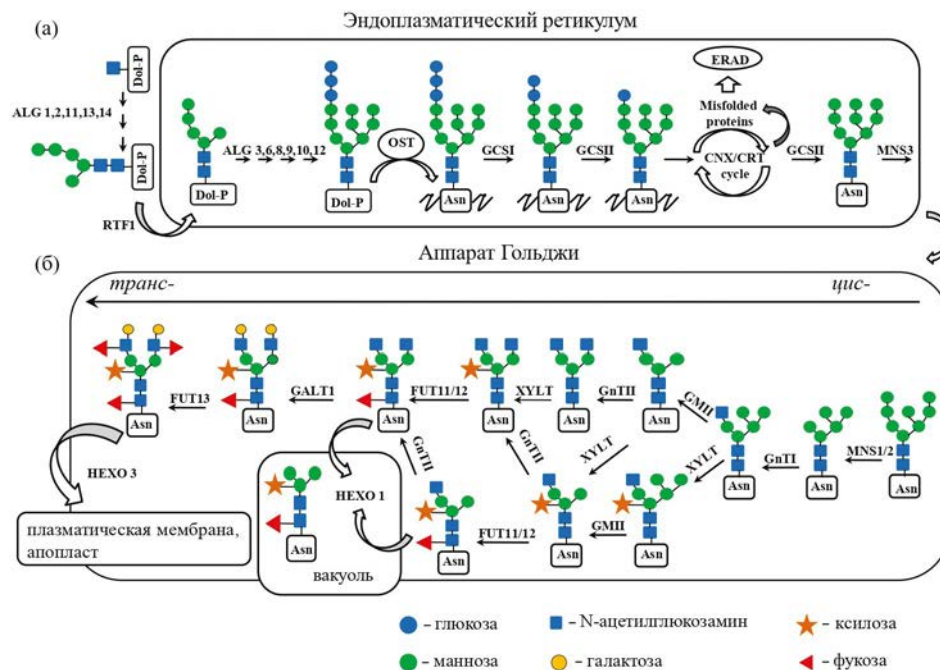


Рис. 2. Схематическое изображение основных этапов процесса N-гликозилирования растений и созревания N-гликанов в эндоплазматическом ретикулуме (а) и аппарате Гольджи (б). Схема составлена с использованием основных этапов и ферментов процессинга на основе материалов, предложенных Nagashima et al. [5] и Strasser [20] с собственными модификациями.

Обозначения: DolP — долихолфосфат; Asn — аспаргин; OST — мультисубъединичный олигосахарилтрансферазный комплекс; CNX — кальнексин; CRT — кальретикулин.

Ферменты, участвующие в формировании N-гликанов: ALG (Asn-linked glycosylation) — ферменты, катализирующие сборку долихолпирофосфат-связанного олигосахарина; RTF1 — флиппаза; GCSI — α -глюкозидаза I; GCSII — α -глюкозидаза II; MNS3 — α -маннозидаза I эндоплазматического ретикулума; MNS1/2 — α -маннозидаза I аппарата Гольджи; GnlTI — N-ацетилглюкозаминилтрансфераза I; GnlTII — N-ацетилглюкозаминилтрансфераза II; GMII — α -маннозидаза II аппарата Гольджи; XYLT — β -1,2-ксилозилтрансфераза; FUT11/12 — коровья α -1,3-фукозилтрансфераза; FUT13 — α -1,4-фукозилтрансфераза; GALT1 — β -1,3-галактозилтрансфераза 1; HEXO1 — N-ацетилгексаминозидаза 1; HEXO3 — N-ацетилгексаминозидаза 3.

синтетического пути является одинаковой во всех эукариотических клетках, и конечным результатом этого этапа являются *N*-гликаны с высоким содержанием маннозы [21].

Покинув эндоплазматический ретикулум, высокоманнозные растительные *N*-гликаны далее могут быть преобразованы в сложные или гибридные при прохождении из цис-цистерн через медиальные в транс-цистерны аппарата Гольджи (рис. 26). В это время благодаря действию различных гликозидаз и гликозилтрансфераз происходит удаление остатков маннозы и последовательное добавление специфических углеводных остатков [11, 20]. Сигналом для инициации образования сложных гликанов является присоединение с помощью *N*-ацетилглюкозаминтрансферазы I (GNTI) хотя бы одного концевых остатка *N*-глюкозамина (GlcNAc) к α -1,3-маннозной ветви олигосахарида с высоким содержанием маннозы ($\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$). Это является также предпосылкой для последующей модификации, а именно — удаления остатков маннозы и присоединения второго концевых остатка GlcNAc с помощью *N*-ацетилглюкозаминтрансферазы II (GNTII) на α -1,6-маннозную ветвь. В случае *N*-гликанов гибридного типа модификации происходят только по α -1,3-маннозной ветви, в то время как α -1,6-маннозная ветвь сохраняет свои остатки маннозы. На этой же стадии может происходить α -1,3-фукозилирование и β -1,2-ксилозилирование корового гликана ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$), образуя специфические для растений *N*-гликаны [20]. Необходимым условием для переноса α -1,3-фукозы и β -1,2-ксилозы является наличие, по крайней мере, одного терминального GlcNAc [23]. Идентификация растительных *N*-гликанов, содержащих либо α -1,3-фукозу, либо β -1,2-ксилозу показала, что эти две модификации не коррелируют между собой и являются полностью независимыми событиями [22].

Далее часть сложных *N*-гликанов подвергается модификациям в транс-сети аппарата Гольджи путем прикрепления β -1,3-галактозы и α -1,4-фукозы, что приводит к образованию структур Льюиса А (Le^a -type) [24]. Помимо аппарата Гольджи, где они формируются, Le^a -структуры могут быть локализованы на клеточной поверхности [25] или присутствовать на гликопротеинах, секретируемых клетками растений [26].

После созревания в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи *N*-гликаны сложного типа могут быть дополнительно модифицированы во время транспорта гликопротеина в конечный пункт назначения. На примере *A. thaliana* было показано, что специфическое отщепление концевых остатков GlcNAc в вакуолях и плазмалемме осуществляет β -*N*-ацетил-

гексозаминидаза 1 (HEXO1) и β -*N*-ацетилгексозаминидаза 3 (HEXO3), соответственно [27]. В результате образуется отдельный тип *N*-гликанов — усеченные или низкоманнозные (paucimannosidic type). Долгое время этот тип гликанов, обнаруживаемых на вакуолярных и секретируемых гликопротеинах, считался уникальным для беспозвоночных животных и растений [28].

Таким образом, процессинг *N*-гликанов в растениях приводит к образованию нескольких типов гликанов, которые в зависимости от углеводных остатков, присоединенных к общей структуре ядра ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$), можно подразделить на высокоманнозные, сложные и гибридные. Высокоманнозные гликаны содержат только остатки маннозы (от двух до шести), присоединенные к коровому олигосахариду [21]. Гликаны с высоким содержанием маннозы в растениях аналогичны гликанам, обнаруженным в клетках млекопитающих. Группа гликанов сложного типа, несущих остатки GlcNAc на своих антеннах, более разнообразна и представлена в растениях двухантенными формами, тогда как у млекопитающих *N*-гликаны этого типа могут быть более разветвленными [4]. Зрелые растительные гликаны сложного типа несут β -1,2-связанные остатки ксилозы и α -1,3-связанные остатки фукозы, присоединенные к коровому олигосахариду $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. Эта структура считается типичной растительной гликоформой и присутствует во всех проанализированных видах растений [29]. Для других видов сложных гликанов используют специфические названия. Так, например, Le^a -содержащие гликаны — это гликаны с терминальным трисахаридом ($\text{Fuc}\alpha 1,4(\text{Gal}\beta 1,3)\text{GlcNAc}$), так называемой структурой Льюиса А [24]. Многие растительные *N*-гликаны сложного типа утрачивают концевые остатки GlcNAc на невозстанавливающихся концах [30–32] и относятся к отдельному типу низкоманнозных *N*-гликанов (рис. 3). Гликаны гибридного типа — это гликаны, у которых на концевых антеннах присутствуют как остатки GlcNAc, так и остатки маннозы. В целом около 90% составляют две гликоформы: гликаны сложного типа (до 60%) с β -1,2-связанными остатками ксилозы и α -1,3-связанными остатками фукозы и гликаны с высоким содержанием маннозы (до 20–40%). Другие гликоформы составляют в сумме обычно не более 20% [33].

В целом, анализ данных литературы создает впечатление достаточно хорошей изученности процесса *N*-гликозилирования в растениях, поскольку к настоящему моменту установлены основные этапы созревания *N*-гликанов [4], охарактеризованы ключевые игроки данного процесса [21] и выявлены основные типы гли-

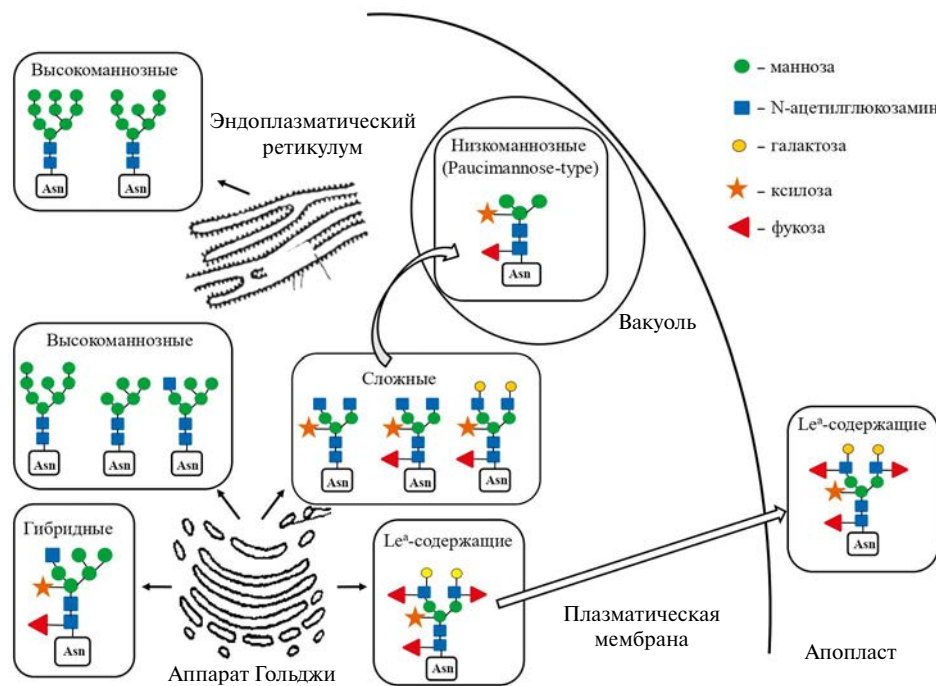


Рис. 3. Типы структур *N*-гликанов растительных гликопротеинов и их локализация в клетке.

Высокоманнозные *N*-гликаны – гликаны, содержащие исключительно остатки маннозы, присоединенные к коровому олигосахариду. Гликаны сложного типа несут β -1,2-связанные остатки ксилозы и α -1,3-связанные остатки фукозы, присоединенные к коровому олигосахариду $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. Le^a-содержащие гликаны – гликаны с терминальным трисахаридом ($\text{Fuc}\alpha 1,4(\text{Gal}\beta 1,3)\text{GlcNAc}$). Низкоманнозные гликаны (рауциманнозные) – гликаны, не содержащие концевых остатков *N*-глюкозамина (GlcNAc) на своих невосстанавливающих концах. Гликаны гибридного типа – гликаны, у которых на концевых антеннах присутствуют как остатки GlcNAc , так и остатки маннозы.

канов, декорирующих белки растений [29, 33]. Тем не менее, некоторые вопросы остаются открытыми. Например, возможно, что перечень известных к настоящему времени ферментов процессинга гликанов не является исчерпывающим, поскольку идентификация ферментов *N*-гликозилирования в растениях может представлять определенную трудность, так как большинство гликозилтрансфераз в аппарате Гольджи участвует в биосинтезе различных полисахаридов клеточной стенки. При этом нельзя исключить, что некоторые из этих ферментов могут генерировать редкие модификации *N*-гликанов. Кроме того, ощущается недостаток как числа, так и разнообразия существующих мутантов процессинга *N*-гликанов. Полученные к настоящему времени мутанты, с одной стороны, не охватывают все этапы формирования гликанов, а с другой стороны, мутации могут оказывать плейотропный эффект на многочисленные гликопротеины, участвующие в том или ином процессе. Наконец, один из важнейших вопросов – как осуществляется регуляция этапов процессинга *N*-гликанов. Было показано, что биосинтез *N*-гликанов сложного типа в растениях регулируется через гомеостаз марганца и кальция с участием недавно идентифицированного

трансмембранного белка 165 (TMEM165) [9], однако очевидно, что регуляция такого сложного процесса, как *N*-гликозилирование должна быть многофакторной с привлечением большого количества участников. Таким образом, исследование процесса *N*-гликозилирования белков у растений все еще нуждается в дополнениях и детализации.

РОЛЬ *N*-ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ В ПРОЦЕССАХ РОСТА, РАЗВИТИЯ И В ОТВЕТАХ РАСТЕНИЙ НА СТРЕССОВЫЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ

N-связанные гликаны влияют на конформацию, стабильность и биологическую активность гликопротеинов растений, а также на их субклеточную локализацию и секрецию [11, 21]. Это, в свою очередь, оказывает влияние на такие жизненно важные процессы, как рост, развитие и устойчивость к неблагоприятным факторам окружающей среды [5, 15, 20]. Так, широкомасштабный анализ *N*-гликозилированных белков в листьях проростков пшеницы позволил идентифицировать 248 *N*-связанных гликопротеинов, которые, по мнению авторов, могут играть важную роль в росте растений. Эти гликопротеины

в основном были вовлечены в реконструкцию клеточных стенок, клеточную сигнализацию, реакции на стресс [34]. Значительные различия в количестве гликопротеинов и степени их гликозилирования были выявлены на разной стадии спелости плодов томата (*Solanum lycopersicum* L.), у которых по мере созревания повышался уровень гликозилирования ферментов, участвующих в размягчении плодов (α -маннозидаза, β -D-N-ацетилгексозаминидаза) [35].

Наглядным доказательством значимости процесса N-гликозилирования для роста и развития служат растения с нарушением отдельных этапов формирования гликанов. Снижение фотосинтетической способности и уменьшение сухой массы выявлялись у мутантов *A. thaliana* *alg3-3* (*asparagines linked glycosylation 3*), дефектных по биосинтезу долихолфосфат-связанных гликанов и *cgl1-1* (*complex glycan less*), в которых полностью отсутствовали сложные N-гликаны [13]. Кроме того, корни *cgl1* имели более длинные корневые волоски [14] и сильнее реагировали на фитогормоны, показывая, что сложные гликаны могут быть связаны с гомеостазом гормонов в растениях. У проростков томатов (*S. lycopersicum* L.) с сильно сниженной активностью N-ацетилглюкозаминтрансферазы I наблюдался некроз плодоножек и раннее опадение плодов, а растения с редуцированной α -маннозидазой II аппарата Гольджи имели скрученные листья и пониженную способность к образованию семян [15]. Потеря функции N-ацетилглюкозаминтрансферазы II у *A. thaliana* предотвращала образование гликанов с двумя концевыми остатками GlcNAc, и мутанты *gntII* показывали многочисленные фенотипы развития, включая раннее цветение и ускоренное старение листьев в темноте [36].

Наличие или отсутствие N-гликанов у гликопротеинов оказывало значительное влияние и на устойчивость растений к различным стрессовым воздействиям [4, 37, 38]. Так, анализ N-гликопротеома плазматической мембраны листьев проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.), подвергнутых действию засухи, выявил изменение уровня гликозилирования большинства идентифицированных гликопротеинов, которые обладали протеинкиназной активностью или были вовлечены в рецепцию и трансдукцию внеклеточных сигналов, а также в ремоделирование клеточной стенки растений [2]. В кончиках корней сои (*Glycine max* (L.) Merr.), подвергнутых затоплению, наблюдалось накопление одних N-гликопротеинов (связанных с деградацией белков, клеточной стенкой и гликолизом) и снижение других (гликозилгидролазы, пероксидазы, белки, связанные с защитной реакцией на стресс) [39]. Изменение количества N-гликопротеинов у проростков томатов (*S. lycopersicum* L.)

влияло на их способность адаптироваться к солевому стрессу [40]. Мутанты *lew3* (*leaf wilting 3*) *A. thaliana* с нарушением одного из ранних этапов процессинга N-гликанов, а именно переноса маннозы на долихол-связанный олигосахарид на цитозольной стороне мембраны эндоплазматического ретикулума, были более чувствительны к осмотическому стрессу [41].

Важность процесса N-гликозилирования была показана для выживания растений в условиях различных биотических стрессов [37, 38, 42]. Профиль N-гликанов проростков *A. thaliana*, инфицированных бактерией *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, значительно отличался от такового у контрольных растений, показывая повышенное содержание низкоманнозных гликоформ и накопление неправильно свернутых гликопротеинов [42]. Мутантные линии *A. thaliana*, дефектные по ферменту синтеза предшественника N-гликанов *alg3* или по субединице олигосахарилтрансферазного комплекса *stt3a* (*staurosporin and temperature sensitive 3a*), были более восприимчивы к заражению *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 по сравнению с растениями дикого типа, а последний мутант проявлял чувствительность еще и к *Erwinia carotovora* sub sp. *carotovora* [37, 43]. На примере *stt3a* было показано, что эффект N-гликозилирования на устойчивость к биотическим стрессорам может проявляться на уровне рецепции сигналов. У этих мутантов нарушалась функциональная активность рецепторных протеинкиназ EFR и FLS2, восприимчивых к бактериальным факторам элонгации трансляции Tu (*elf18*) и флагеллину (*flg22*), соответственно [44]. По мнению авторов, именно N-гликаны, прикрепленные к эктодоменам рецепторов опознавания паттернов (Pattern Recognition Receptors (PRRs)) плазматической мембраны, играют критическую роль в распознавании лигандов при взаимодействии растений и патогенов. Защитные реакции, направленные против вирусных и микробных патогенов, могут быть опосредованы белками-шаперонами, участвующими в процессе фолдинга гликопротеинов в эндоплазматическом ретикулуме [45]. Так, было показано, что специфичный для растений кальретикулин NbCRT3a, участвующий в созревании гликозилированных рецепторов клеточной поверхности, вовлечен в формирование устойчивости *N. benthamiana* к заражению *Phytophthora infestans* [46].

Изменение процесса N-гликозилирования белков не только путем нарушения прохождения его этапов, но и с помощью модификации отдельных остатков сахаров в гликане, может также влиять на рост и устойчивость растений. Проростки *O. sativa*, лишённые остатков коровой α -1,3-фукозы, демонстрировали полукарликовый фенотип и сниженный гравитропический

ответ [19], а отсутствие остатков ксилозы на коровом олигосахариде приводило к повышению чувствительности растений к низкотемпературному стрессу [47]. У *A. thaliana* отсутствие остатков фукозы на коровом N-гликане усиливало чувствительность мутантов к засолению, при этом отсутствие ксилозы не сопровождалось таким эффектом [15]. Для удлинения корневых волосков у *A. thaliana* были важны не столько модификации корового гликана, связанные с присоединением ксилозы или фукозы, сколько терминальные модификации сложных гликанов, такие как наличие остатков маннозы или отсутствие остатков GlcNAc на обеих антеннах или блокировка терминальных удлинений [14]. Удаление терминальных остатков маннозы на N-гликанах являлось необходимым как для процесса образования корней [48], так и для формирования устойчивости проростков *A. thaliana* к солевому и осмотическому стрессам [49].

При обширном количестве статей о роли N-гликозилирования в процессах, протекающих в растениях [34–38; 47–49], все еще остается некоторая разрозненность публикуемых данных. До сих пор нет целостного представления, как отдельные сахара или наборы гликоформ влияют на свойства белков, к которым они присоединены. Какие гликопротеины играют ключевую роль в том или ином процессе? Как меняется структура гликанов в ходе развития этих процессов? Для построения более полной картины участия N-гликозилирования белков в процессах роста, развития и в ответах растений на стрессовые воздействия, требуется расширение, как перечня исследуемых воздействий, так и набора объектов исследования. Помимо этого, исследования структуры и функции гликанов должны развиваться параллельно. Так, наблюдаемые во время развития или в стрессовых условиях отличия в N-гликозилировании белков желательно сопровождать анализом структурных модификаций N-гликанов на отдельных гликопротеинах, и, наоборот, выявленные структурные изменения необходимо подкреплять экспериментами, демонстрирующими роль этих структур в функционировании того или иного процесса.

ОСНОВНЫЕ МОМЕНТЫ, КОТОРЫЕ НЕОБХОДИМО УЧИТЫВАТЬ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ПРОЦЕССА N-ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ В РАСТЕНИЯХ

Количество сайтов и разнообразие гликоформ на гликобелках. Количество сайтов гликозилирования у растений может ограничиваться одним-двумя, как у гликопротеина семян фасоли — фазеолина [50] и миракулина — гликопротеина *Synsepalum dulcicum* [51], доходить до восьми, как

у мембранно-связанной эндо- β -1,4-глюканазы [52] или даже до 15, как у лакказы — фермента, относящегося к классу оксидаз [24]. При этом количество сайтов гликозилирования не определяется ни наличием остатков аспарагина в гликопротеине, ни даже консенсусной последовательностью узнавания (Asn-X-Ser/Thr), так как только для 2/3 этих секвенсов доказан факт гликозилирования [53]. Это указывает на то, что необходимо учитывать влияние и других факторов при прогнозировании количества сайтов. Так, было показано, что наличие или отсутствие определенных аминокислотных остатков в консенсусной последовательности или рядом с ней [53], а также трехмерная структура белка [54] играют немаловажную роль в определении количества сайтов и типа их гликозилирования. Сайты гликозилирования обычно находятся на гидрофобных участках поверхности белка [55], а расположение аспарагина на β -витке белковой молекулы обеспечивает доступность для олигосахарилтрансферазы [56]. При этом топология белков может быть такова, что большинство их потенциальных сайтов N-гликозилирования не обращены в просвет эндоплазматического ретикулума или аппарата Гольджи и поэтому недоступны для олигосахарилтрансферазы [57].

Несмотря на существование ограниченного числа типов гликоформ, используемых для модификации гликопротеинов растений (рис. 3) [21], их количества достаточно для получения значительной макрорегетерогенности (формируемой занятостью сайтов гликозилирования на молекуле белка) и микрогетерогенности (характеризующей разнообразие содержания разных гликоформ в отдельном сайте) N-гликанов, наблюдаемых в растительных организмах [33]. Макрорегетерогенность определяется спецификой организма, типом клеток, а также структурными характеристиками белковой молекулы [58]. Микрогетерогенность возникает из-за вариаций процессинга N-гликанов, который зависит от многочисленных клеточных факторов, включая специфичную для тканей/клеток экспрессию ферментов, их концентрации и кинетические параметры, доступность доноров нуклеотидных сахаров, а также время пребывания гликопротеинов в различных клеточных компартментах. Структурный анализ зрелых гликопротеинов показал, что некоторые гликопротеины модифицированы исключительно гликанами высокоманнозного типа, в то время как другие имеют как высокоманнозный тип гликанов, так и N-гликаны сложного или низкоманнозного типа на разных сайтах N-гликозилирования [59]. Это показывает, что на одном и том же гликопротеине некоторые N-гликаны подвергаются модификации в аппарате Гольджи и после его прохождения, в то время как другие — нет, что определяется их доступностью процессинго-

вым ферментам. Например, гликопротеин семян фасоли фазеолин гликозилирован гликаном низкоманнозного типа и гликаном с высоким содержанием маннозы, что связано с плохой доступностью последнего для ферментов и отсутствием возможности его дальнейшей модификации [50].

Все это приводит к разнообразию количества гликанов, степени их модификации и разнородности олигосахаридных структур на одном и том же гликопротеине [59], что необходимо учитывать, в частности, при производстве рекомбинантных белков [60, 61]. Поэтому в зависимости от поставленных целей при исследовании процесса гликозилирования необходимо использовать разные подходы. Например, анализ интактных гликопептинов и дегликозилированных пептидов позволяет оценить макрорегерогенность гликозилирования, но только анализ интактных гликопептинов позволит охарактеризовать микрогетерогенность [62]. При этом и в том и другом случае структурный анализ гликанов останется за рамками исследования и будет возможен только при высвобождении их из гликопротеинов [63].

Особенности *N*-гликозилирования, связанные с локализацией гликопротеинов. Анализ распределения *N*-гликопротеинов в интегральных белках вакуолярной и плазматической мембран *A. thaliana* показал, что потенциальные сайты *N*-гликозилирования гораздо реже встречаются в белках тонопластов и, в отличие от плазматической мембраны растений, тонопласт почти или полностью лишен *N*-гликопротеинов с модифицированными в аппарате Гольджи гликанами [64]. Большинство вакуолярных гликопротеинов и запасных гликопротеинов семян, описанных на данный момент, гликозилированы *N*-гликанами низкоманнозного типа (paucimannosidic type), содержащими остатки фукозы и/или ксилозы, но лишенных концевых остатков глюкозамина [11]. При этом у вакуолярных белков до сих пор не обнаружены Le^a -содержащие гликаны, которые широко представлены у секретируемых и связанных с плазмалеммой гликопротеинов [59]. Поскольку Le^a -содержащие *N*-гликаны обнаруживаются только на внеклеточных гликопротеинах растений, их наличие может служить как маркером транспорта гликопротеинов через секреторную систему растений, так и маркером локализации гликопротеинов в растительной клетке [33].

Таким образом, по модификации *N*-гликанов, декорирующих гликопротеин, можно определить его потенциальную локализацию в клетке растений.

Особенности *N*-гликозилирования, связанные с возрастом растений. Установлено, что профиль гликозилирования эндогенных белков зависит от стадии развития растения или органа [65, 66].

Так, в стареющих листьях проростков табака наблюдалось увеличение количества *N*-гликанов без терминального *N*-ацетилглюкозамина и уменьшение высокоманнозных гликанов [65]. Кроме того, стадия развития и положение листьев (верхний, средний или нижний ярус) влияли на профиль *N*-гликозилирования рекомбинантных белков, экспрессируемых в растениях *Nicotiana plumbaginifolia* [66]. Во время созревания эндосперма кукурузы (*Zea mays* L.) на гликопротеинах наблюдалось изменение типа гликоформ от преимущественно низкоманнозных (paucimannosidic type) к преимущественно гликановым структурам, лишенным фукозы [67]. Содержание Le^a -содержащих *N*-гликанов варьировало во время развития семян как у *A. thaliana*, так и у *Brassica napus* [29].

Особенности *N*-гликозилирования в зависимости от вида и органа растений. Несмотря на то, что в целом механизм *N*-гликозилирования в растениях в высокой степени консервативен с сохранением общей схемы биосинтеза и созревания *N*-гликанов, существуют различия по структуре и соотношению паттернов гликозилирования в зависимости от класса, вида или органа растения [33, 59], что следует иметь в виду при выборе объекта исследования. Так, если у проростков *A. thaliana* преобладают гликаны сложного типа (около 45%) [33], то у *Lotus japonicas* – высокоманнозные (около 49%) [68], а у *N. benthamiana* около 45% составляют низкоманнозные (paucimannosidic type) структуры [69]. При этом наиболее часто используемое модельное растение *A. thaliana* с преобладанием сложных гликановых структур демонстрирует их слабое разнообразие [33], в частности, количество Le^a -содержащих *N*-гликанов сложного типа у проростков резуховидки Таля было незначительным по сравнению с другими видами [25]. Различия в гликозилировании белков были выявлены не только у представителей разных видов, но и у растений, относящихся к более близким таксономическим группам. Например, гликановые профили белка пататина из клубней картофеля отличались у разных подвидов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) [70].

Анализ органоспецифического *N*-гликозилирования, проведенный для оценки распределения Le^a -содержащих гликанов на гликопротеинах *A. thaliana*, показал, что если цветоножки и стебли растений содержали большое количество этих структур, то в стручках, корнях и побегах их количество было невелико и они совсем отсутствовали в листьях и черешках [29]. Семена однодольных растений, таких как рис и кукуруза, были очень бедны структурами с концевыми антеннами Le^a [71] в отличие от семян двудольных, включая гречиху, горох, маш, в которых эти структуры были широко представлены [72].

Эти знания могут быть полезны для правильного выбора объекта, в частности, при производстве терапевтических белков [73], поскольку гликановый профиль фармацевтических препаратов растительного происхождения будет различаться в зависимости от вида, возраста или органа растения, что следует учитывать, например, для того, чтобы снизить количество специфических остатков, вызывающих пищевую аллергию [74].

Проблемы использования мутантов при исследовании процесса N-гликозилирования. Использование мутантных форм с нарушением отдельных звеньев процесса созревания гликанов — обычная практика в исследовании процесса N-гликозилирования и роли гликанов в растениях [21, 75]. Однако следует учитывать, что фенотипические проявления мутаций, нарушающих формирование гликопротеинов, будут зависеть от многих факторов. Это может создать проблемы при попытках установить причинно-следственные связи между первичными дефектами N-гликозилирования и наблюдаемыми изменениями развития, а также затруднить определение целевых белков.

Так, например, солевой стресс приводил к набуханию корней у мутантов *cgl1*, *stt3a* и *lew3* *A. thaliana* [10, 41]. Однако только у первых двух мутантов наблюдалось изменение N-гликозилирования и снижение активности KOR1 (KORRIGAN) [8]. Это позволило предположить, что влияние мутации *lew3* на солечувствительность и развитие растений резуховидки Таля должно быть обусловлено изменением гликозилирования и, соответственно, активности других гликопротеинов, участвующих в осморегуляции [41].

Анализ данных литературы показал, что мутации в генах, кодирующих одни и те же белки или ферменты, участвующие в процессинге гликанов, могут вызывать разные фенотипические проявления в зависимости от вида растения, что хорошо видно при сравнении мутантов *A. thaliana* и *O. sativa*. Так, дефект субъединицы олигосахарилтрансферазы приводил к разному воздействию на рост мутантов *osdgl1* риса [76] и мутантов *dgl1* резуховидки Таля [77]. В первом случае рост проростков лишь немного снижался, а во втором — наблюдалось появление карликового фенотипа. Если у мутантов риса с нарушением работы фермента α -глюкозидазы I эндоплазматического ретикулума (*osmog*) наблюдалось формирование коротких корней [78], то аналогичное нарушение у мутантов *A. thaliana* (*knf*) приводило к летальности эмбрионов [79]. Задержка развития имела место у мутантов риса (*gnt1*) с нарушенной работой фермента аппарата Гольджи — β -1,2-N-ацетилглюкозаминтрансферазы I (GnTI) [18], а мутация *A. thaliana* по

тому же ферменту (*cgl1*) вызывала ростовой дефект только в условиях засоления [10]. Подавление экспрессии гена GnTI, приводящее к снижению количества сложных N-гликанов [20], не приводило к каким-то дефектам роста или размножения у *N. benthamiana* [80], в то время как у растений томата наблюдалось аномальное созревание плодов [15], а у представителя бобовых *L. japonicas* — серьезные дефекты роста с летальностью проростков до достижения ими стадии цветения [68].

Представленные факты еще раз демонстрируют многочисленность и разнообразие ролей, которые N-гликаны могут играть в растениях и то, что эти роли должны рассматриваться в привязке к особенностям того или иного вида. Кроме того, подобный анализ мутантов позволит выявлять такие растения, которые будут хорошо переносить генетические манипуляции и сохранять жизнеспособность в отсутствии привычных для растений типов гликанов, как, например, *N. benthamiana*, которое широко используется для производства биофармацевтических препаратов [81].

ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЗНАНИЙ О ПРИНЦИПАХ И МЕХАНИЗМАХ N-ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ ДЛЯ ГЛИКОИНЖИНИРИНГА РАСТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ

Накопление знаний о принципах и механизмах N-гликозилирования в растениях расширяют возможности их использования в практических целях, в частности, для создания подходящих гликоформ при получении рекомбинантных белков, представляющих терапевтическую ценность [82–84], поскольку в большинстве случаев такие белки являются N-гликозилированными [61], и прикрепленные гликаны оказывают сильное влияние на стабильность, активность и фармакодинамику этих гликопротеинов в организме человека [85].

Однако наличие у растений специфических гликанов, которые отсутствуют у млекопитающих и, следовательно, являются потенциально иммуногенными [74], а также меньшее структурное разнообразие гликанов [5, 82] создают ряд трудностей и порой ограничивают широкое использование растений для фармацевтического производства в качестве альтернативы клеточным линиям млекопитающих. Таким образом, основными задачами гликоинженерии при модификации растительных гликанов являются устранение специфических для растений и введение специфических для клеток млекопитающих реакций, приводящих к так называемой “гуманизации” растений [86]. Наиболее известное и исследованное отличие гли-

кановых структур растений состоит в наличии сложных гликанов, содержащих β -1,2-ксилозу и α -1,3-фукозу [21]. Нокаут соответствующих генов *FucT* и *XylT* у *A. thaliana* приводил к накоплению растениями большого количества структур *N*-гликанов, не содержащих остатков β -1,2-ксилозы и α -1,3-фукозы [22]. Сравнительно недавно с помощью методики CRISPR/Cas9 для направленного редактирования генома были получены линии *N. benthamiana* для производства рекомбинантных белков, полностью лишенных остатков коровой α -1,3-фукозы и/или β -1,2-ксилозы [15]. Другие специфические типы модификаций растительных гликанов – это декорирование корового *N*-гликана β -1,3-галактозой и α -1,4-фукозой (*Le^a*-содержащие гликаны) или удаление концевых остатков GlcNAc от корового гликана, приводящее к формированию низкоманнозных *N*-гликанов (раусиманнозного типа). Хотя последние не так распространены, а эпитопы Льюиса А встречаются и у животных, эти структуры нередко рассматриваются как нежелательные, отрицательно влияющие на эффективность рекомбинантных белков при их терапевтическом применении [69]. Нокаут генов β -1,3-галактозилтрансферазы и α -1,4-фукозилтрансферазы у мха *Physcomitrella patens* приводил к продукции эритропоэтина, лишенного эпитопа Льюиса А [87], а нокаут гена β -гексозаминидазы приводил к снижению низкоманнозных форм (раусиманнозидного типа), значительно увеличивая количество сложных *N*-гликанов на α 1-антитрипсине млекопитающих, продуцируемом *N. benthamiana* [69].

Отсутствие у растений специфичного для млекопитающих набора ферментов гликозилирования приводит к отсутствию у них таких модификаций, как формирование дополнительных антенн, галактозилирование, кэпирование остатками сиаловой кислоты, которые являются специфичными для млекопитающих [86]. Использование контролируемой экспрессии гетерологичных ферментов в *N. tabacum* позволило получить двурассеченные, разветвленные [88] и многоантенные структуры [89], а также гликаны с β -1,4-галактозой [90] и остатками сиаловой кислоты [91]. Последнее особенно важно, поскольку сиалирование – это важная модификация гликопротеинов человека, которая не была реализована в достаточной степени в клетках китайского хомячка, традиционно используемых в качестве платформы для получения рекомбинантных белков [92]. Более того, в *N. benthamiana* за счет комбинированной экспрессии набора ферментов было достигнуто полисиалирование, которое имитировало процесс, имеющий место в клетках млекопитающих [91].

Другой важной задачей инженерии растительных *N*-гликанов является уменьшение их ге-

терогенности для получения стабильной эффективности рекомбинантных гликопротеинов [93]. И если в области “гуманизации” растительных гликанов были достигнуты значительные успехи, то получение препаратов с минимальной гетерогенностью гликанов все еще остается узким местом. Сложность заключается в том, что различия в эффективности *N*-гликозилирования во многом обусловлены свойствами OST-комплекса растений, состоящего из нескольких субъединиц, структурные и функциональные характеристики которых до конца не изучены [94]. Считается, что растительный OST-комплекс имеет уникальные предпочтения в аминокислотных последовательностях, и не все потенциальные сайты *N*-гликозилирования распознаются *in vivo*, что приводит к недостаточному гликозилированию рекомбинантных белков в растениях [18]. Попытки решить эту проблему путем сверхэкспрессии односубъединичного OST-комплекса *Leishmania major* в клетках *N. benthamiana* не привели к ожидаемым результатам [95]. У рекомбинантных гликопротеинов наблюдалось только небольшое увеличение занятости отдельных сайтов, но заполняемость сайтов в целом не улучшалась, а экспрессия чужеродного OST-комплекса оказывала негативное влияние, приводя к снижению общего выхода продуцируемых белков [95]. Вместе с тем, некоторые исследования опровергают существующее мнение, что недостаточное гликозилирование приводит к потере выхода целевых белков, поскольку значительное агликозилирование не только не влияло на выход и сборку антител mAb 2G12, накапливаемых в рисе, но даже увеличивало их ВИЧ-нейтрализующую активность [96]. Таким образом, должны быть предприняты дополнительные усилия для исследования структуры и функциональности OST-комплекса растений, чтобы понять, чем вызваны наблюдаемые противоречия и как можно преодолеть существующие ограничения в гликозилировании растительных белков. Кроме того, стремление получить однородный материал с использованием подходов, направленных на снижение гетерогенности гликанов, будет приводить к потере отдельных гликоформ, имеющих уникальные физические или биологические свойства, которые могут быть полезны в определенных случаях. Например, низкоманнозные *N*-гликаны (раусиманнозидного типа) в целом рассматриваются как нежелательные при производстве рекомбинантных терапевтических белков, и в основном используются приемы, позволяющие снизить их количество [69]. Однако было показано, что некоторые из них необходимы для обеспечения доставки биофармацевтических препаратов к клеткам-мишеням при лечении заболеваний, относящихся к классу лизосомных болезней на-

копления (Lysosomal Storage Diseases), таких как мукополисахаридозы, муколипидозы, гликогенозы [97]. Так, структура $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ обладала повышенной способностью к связыванию с маннозным рецептором на поверхности клеток по сравнению со структурами, имеющими более высокое содержание остатков маннозы [97], и были разработаны специальные методические подходы, нацеленные на повышение содержания этих структур в клетках растений [98].

Узким местом производства терапевтических белков в растительных экспрессионных системах считается этап фолдинга целевых белков и низкие уровни, наблюдаемые при накоплении вирусных или бактериальных гликопротеинов в растениях, что, по мнению исследователей, может быть отражением различий в механизме функционирования их шаперонов [99]. Внедрение шаперонов, полученных из того же источника, что и целевые белки, способствовало улучшению сворачивания и увеличению накопления рекомбинантных белков, как было показано при коэкспрессии шаперонов млекопитающих в *N. benthamiana* [99]. Однако узкий набор исследованных к настоящему времени гликопротеинов и шаперонов ограничивает использование этого гликоинженерного подхода для производства рекомбинантных вакцин.

В последнее время успешной стратегией является объединение сразу нескольких подходов. Например, для качественного и количественного улучшения производства антигена внешней оболочки ВИЧ-1 использовали растения *N. benthamiana*, лишенные α -1,3-фукозилтрансферазы и β -1,2-ксилозилтрансферазы, для предотвращения образования специфичных для растений сложных N-гликанов. Одновременно применяли РНК-интерференцию для подавления образования маломаннозных гликанов и коэкспрессию кальретикулина с олигосахарилтрансферазой *Leishmania major* с целью улучшения занятости сайтов [84].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хотя в изучении процесса N-гликозилирования растений и анализе биологической роли гликанов в последнее время были достигнуты значительные успехи [15, 20, 36, 51], все еще существуют узкие места, ограничивающие дальнейшее продвижение этих исследований. Во многом это связано как с очисткой отдельных гликанов и гликопротеинов, так и с их структурной и функциональной характеристикой. Если в решении первого вопроса наблюдается неуклонное продвижение вперед [100–102], то более сложная функциональная характеристика гликопротеинов растений и декорирующих их гликанов, требующая больше усилий и време-

ни, значительно отстает, хотя очевидно, что эти исследования должны развиваться параллельно. Изучение совокупности всех гликанов и гликопротеинов, выявляемых в клетке, ткани или в целом растительном организме в определенное время, в определенном месте и при определенных условиях, является пока еще недостижимым идеалом. Но именно такой всеобъемлющий подход позволит лучше понять разнообразные роли различных гликанов, модифицирующих белки, выявляя их вклад в функционирование растительного организма, давая полезную информацию, которую можно было бы использовать в практических целях. Исследованию процесса N-гликозилирования способствует полное секвенирование генома у все большего числа видов растений и доступность технологий его редактирования, что открывает пути для эффективных модификаций реакций процессинга N-гликанов. Получение мутантов с использованием методик сайт-направленного мутагенеза по сайтам гликозилирования отдельных гликопротеинов также является эффективным направлением для исследования роли того или иного гликана.

Вместе с тем биохимические исследования гликозилированных белков резко ограничиваются методическими сложностями. Для полного понимания механизмов реализации функции гликозилированного белка необходима характеристика того, какой именно гликан и в каком именно из потенциально возможных сайтов присоединен к белку. Пока подобные сведения крайне сложно получить даже для индивидуального белка, не говоря о сложных их совокупностях. Одна из существенных проблем в области гликопротеомики растений — это разработка надежных биоинформатических инструментов для анализа гликанов. Из-за сложности и разнообразия возникающих фрагментов, которые меняются в зависимости от условий проводимой масс-спектрометрии при фрагментации гликопротеинов и гликанов, а также высокого уровня гетерогенности гликанов, имеются ограничения для крупномасштабной идентификации гликопротеинов посредством поиска в базах данных. Поэтому длительная обработка данных вручную является узким местом для характеристики гликопротеинов.

Тем не менее, несмотря на то, что в гликобиологии растений остается много нерешенных вопросов, расширение методической базы в области протеомики, появление новых стратегий обогащения, разделения и анализа гликанов, разработка в области редактирования генов, развитие методов моделирования сложных гликанов и гликозилированных белков вносят оптимистическую ноту в перспективу развития этого направления. Увеличение количества

идентифицированных гликопротеинов и сайтов гликозилирования, которые связаны с ростом и развитием растений и с их реакцией на окружающую среду, поможет в расшифровке механизмов гликозилирования растительных белков и будет способствовать пониманию их функциональной роли в этих процессах.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда № 20-64-47036, а также Государственного задания Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук”.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hashiguchi A., Komatsu S. Impact of post-translational modifications of crop proteins under abiotic stress // *Proteomes*. 2016. V. 4. P. 42. <https://doi.org/10.3390/proteomes4040042>
2. Chang Y., Zhu D., Duan W., Deng X., Zhang J., Ye X., Yan Y. Plasma membrane *N*-glycoproteome analysis of wheat seedling leaves under drought stress // *Int. J. Biol. Macromol.* 2021. V. 193. P. 1541. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.217>
3. Muleya V., Lois L.M., Chahtane H., Thomas L., Chiapello M., Marondedze C. (De)activation (ir) reversibly or degradation: dynamics of post-translational protein modifications in plants // *Life*. 2022. V. 12. P. 324. <https://doi.org/10.3390/life12020324>
4. Nguema-Ona E., Vicre-Gibouin M., Gotte M., Plancot B., Lerouge P., Bardor M., Driouich A. Cell wall *O*-glycoproteins and *N*-glycoproteins: aspects of biosynthesis and function // *Front. Plant Sci.* 2014. V. 5. P. 499. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00499>
5. Nagashima Y., von Schaewen A., Koiwa H. Function of *N*-glycosylation in plants // *Plant Sci.* 2018. V. 274. P. 70. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.05.007>
6. Mellquist J., Kasturi L., Spitalnik S., Shakin-Eshleman S. The amino acid following an Asn-X-Ser/Thr sequon is an important determinant of *N*-linked core glycosylation efficiency // *Biochem.* 1998. V. 37. P. 6833. <https://doi.org/10.1021/bi972217k>
7. Shakin-Eshleman S., Spitalnik S., Kasturi L. The amino acid at the X position of an Asn-X-Ser sequon is an important determinant of *N*-linked core-glycosylation efficiency // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 6363. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.11.6363>
8. Hebert D., Lamriben L., Powers E., Kelly J. The intrinsic and extrinsic effects of *N*-linked glycans on glycoproteostasis // *Nat. Chem. Biol.* 2014. V. 10. P. 902. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1651>
9. Toustou C., Walet-Balieu M.-L., Kiefer-Meyer M.-C., Houdou M., Lerouge P., Foulquier F., Bardor M. Towards understanding the extensive diversity of protein *N*-glycan structures in eukaryotes // *Biol. Rev.* 2022. V. 97. P. 732. <https://doi.org/10.1111/brv.12820>
10. Kang J.S., Frank J., Kang C.H., Kajiura H., Vikram M., Ueda A., Kim S., Bahk J.D., Triplett B., Fujiyama K., Lee S.Y., von Schaewen A., Koiwa H. Salt tolerance of *Arabidopsis thaliana* requires maturation of *N*-glycosylated proteins in the Golgi apparatus // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008. V. 105. P. 5933. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800237105>
11. Lannoo N., Van Damme E.J.M. Review/*N*-glycans: the making of a varied toolbox // *Plant Sci.* 2015. V. 239. P. 67. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.06.023>
12. Morales-Quintana L., Méndez-Yáñez A. α -Mannosidase and β -D-*N*-acetylhexosaminidase outside the wall: partner exoglycosidases involved in fruit ripening process // *Plant Mol. Biol.* 2023. V. 112. P. 107. <https://doi.org/10.1007/s11103-023-01356-2>
13. Jiao Q.-S., Niu G.-T., Wang F.-F., Dong J.-Y., Chen T.-S., Zhou C.-F., Hong Z. *N*-glycosylation regulates photosynthetic efficiency of *Arabidopsis thaliana* // *Photosynthetica*. 2020. V. 58. P. 72. <https://doi.org/10.32615/ps.2019.153>
14. Frank M., Kaulfürst-Soboll H., Fischer K., von Schaewen A. Complex-type *N*-glycans influence the root hair landscape of *Arabidopsis* seedlings by altering the auxin output // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12. P. 635714. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.635714>
15. Kaulfürst-Soboll H., Mertens-Beer M., Brehler R., Albert M., von Schaewen A. Complex *N*-glycans are important for normal fruit ripening and seed development in tomato // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12. P. 635962. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.635962>
16. Jansing J., Sack M., Augustine S.M., Fischer R., Bortesi L. CRISPR/Cas9-mediated knockout of six glycosyltransferase genes in *Nicotiana benthamiana* for the production of recombinant proteins lacking b-1,2-xylose and core a-1,3-fucose // *Plant Biotechnol. J.* 2019. V. 17. P. 350. <https://doi.org/10.1111/pbi.12981>
17. Herman X., Far J., Courtoy A., Bouhon L., Quinton L., De Pauw E., Chaumont F., Navarre C. Inactivation of *N*-acetylglucosaminyltransferase I and α 1,3-fucosyltransferase genes in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells results in glycoproteins with highly homogeneous, high-mannose *N*-glycans // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12. P. 634023. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.634023>
18. Fanata W.I., Lee K.H., Son B.H., Yoo J.Y., Harmoko R., Ko K.S., Ramasamy N.K., Kim K.H.,

- Oh D.-B., Jung H.S., Kim J.-Y., Lee S.Y., Lee K.O.* N-glycan maturation is crucial for cytokinin-mediated development and cellulose synthesis in *Oryza sativa* // *Plant J.* 2013. V. 73. P. 966.
<https://doi.org/10.1111/tpj.12087>
19. *Harmoko R., Yoo J.Y., Ko K.S., Ramasamy N.K., Hwang B.Y., Lee E.J., Kim H.S., Lee K.J., Oh D.-B., Kim D.-J., Lee S., Li Y., Lee S.Y., Lee K.O.* N-glycan containing a core α 1,3-fucose residue is required for basipetal auxin transport and gravitropic response in rice (*Oryza sativa*) // *New Phytol.* 2016. V. 212. P. 108.
<https://doi.org/10.1111/nph.14031>
 20. *Strasser R.* Recent developments in deciphering the biological role of plant complex N-glycans // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13. P. 897549.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.897549>
 21. *Strasser R.* Plant protein glycosylation // *Glycobiology.* 2016. V. 26. P. 926.
<https://doi.org/10.1093/glycob/cww023>
 22. *Strasser R., Altmann F., Mach L., Glössl J., Steinkellner H.* Generation of *Arabidopsis thaliana* plants with complex N-glycans lacking b-1,2-linked xylose and core a-1,3-linked fucose // *FEBS Lett.* 2004. V. 561. P. 132.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00150-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00150-4)
 23. *Johnson K.D., Chrispeels M.J.* Substrate specificities of N-acetylglucosaminyl-, fucosyl-, and xylosyltransferases that modify glycoproteins in the Golgi apparatus of bean cotyledon // *Plant Physiol.* 1987. V. 84. P. 1301.
<https://doi.org/10.1104/pp.84.4.1301>
 24. *Beihammer G., Maresch D., Altmann F., Van Damme E.J.M., Strasser R.* Lewis A glycans are present on proteins involved in cell wall biosynthesis and appear evolutionarily conserved among natural *Arabidopsis thaliana* accessions // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12. P. 630891.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.630891>
 25. *Fitchette-Lainé A.C., Gomord V., Cabanes M., Michalski J.-C., Saint Macary M., Foucher B., Cavelier B., Hawes C., Lerouge P., Faye L.* N-glycans harboring the Lewis a epitope are expressed at the surface of plant cells // *Plant J.* 1997. V. 12. P. 1411.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1997.12061411.x>
 26. *Ruiz-May E., Kim S.-J., Brandizzi F., Rose J.K.C.* The secreted plant N-glycoproteome and associated secretory pathways // *Front. Plant Sci.* 2012. V. 3. P. 117.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00117>
 27. *Liebinger E., Veit C., Pabst M., Batoux M., Zipfel C., Altmann F., Mach L., Strasser R.* Beta-N-acetylhexosaminidases HEXO1 and HEXO3 are responsible for the formation of paucimannosidic N-glycans in *Arabidopsis thaliana* // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 10793.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.178020>
 28. *Melo N.S., Nimtz M., Conradt H.S., Fevereiro P.S., Costa J.* Identification of the human Lewis (a) carbohydrate motif in a secretory peroxidase from a plant cell suspension culture (*Vaccinium myrtillus* L.) // *FEBS Lett.* 1997. V. 415. P. 186.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01121-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01121-6)
 29. *Gomord V., Fitchette A.-C., Menu-Bouaouiche L., Saint-Jore-Dupas C., Plasson C., Michaud D., Faye L.* Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production // *Plant Biotechnol. J.* 2010. V. 8. P. 564.
<https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00497.x>
 30. *Lerouge P., Cabanes-Macheteau M., Rayon C., Fitchette-Laine A.-C., Gomord V., Faye L.* N-Glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends // *Plant Mol. Biol.* 1998. V. 38. P. 31.
<https://doi.org/10.1023/A:1006012005654>
 31. *Fitchette A.C., Cabanes-Macheteau M., Marvin B., Satiat-Jeunemaitre B., Gomord V., Lerouge P., Faye L., Hawes C.* Biosynthesis and immunolocalization of Lewis a-containing N-glycans in the plant cells // *Plant Physiol.* 1999. V. 121. P. 333.
<https://doi.org/10.1104/pp.121.2.333>
 32. *Gutternigg M., Kretschmer-Lubich D., Paschinger K., Rendić D., Hader J., Geier P., Ranftl R., Jantsch V., Lochnit G., Wilson I.B.H.* Biosynthesis of truncated N-linked oligosaccharides results from non-orthologous hexosaminidase-mediated mechanisms in nematodes, plants and insects // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 27825.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M704235200>
 33. *Zeng W., Ford K.L., Bacic A., Heazlewood J.L.* N-linked glycan micro-heterogeneity in glycoproteins of *Arabidopsis* // *Mol. Cell. Proteomics.* 2018. V. 17. P. 413.
<https://doi.org/10.1074/mcp.RA117.000165>
 34. *Wang X., Deng X., Zhu D., Duan W., Zhang J., Yan Y.* N-linked glycoproteome analysis reveals central glycosylated proteins involved in wheat early seedling growth // *Plant Physiol. Biochem.* 2021. V. 163. P. 327.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.04.009>
 35. *Zhang X., Tang H., Du H., Liu Z., Bao Z., Shi Q.* Comparative N-glycoproteome analysis provides novel insights into the regulation mechanism in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) during fruit ripening process // *Plant Sci.* 2020. V. 293. P. 110413.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110413>
 36. *Yoo J.Y., Ko K.S., Vu B.N., Lee Y.E., Yoon S.H., Pham T.T., Kim J.-Y., Lim J.-M., Kang Y.J., Hong J.C., Lee K.O.* N-acetylglucosaminyltransferase II is involved in plant growth and development under stress conditions // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12. P. 761064.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.761064>
 37. *Kang B.S., Baek J.H., Macoy D.M., Chakraborty R., Cha J.-Y., Hwang D.-J., Lee Y.H., Lee S.Y., Kim W.Y., Kim M.G.* N-glycosylation process in both ER and Golgi plays pivotal role in plant immunity // *J. Plant Biol.* 2015. V. 58. P. 374.
<https://doi.org/10.1007/s12374-015-0197-3>
 38. *Lin B., Qing X., Liao J., Zhuo K.* Role of protein glycosylation in host-pathogen interaction // *Cells.* 2020. V. 9. P. 1022.
<https://doi.org/10.3390/cells9041022>

39. *Mustafa G., Komatsu S.* Quantitative proteomics reveals the effect of protein glycosylation in soybean root under flooding stress // *Front. Plant Sci.* 2014. V. 5. P. 627.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00627>
40. *Zhang X., Tang H., Du H., Bao Z., Shi Q.* Sugar metabolic and *N*-glycosylated profiles unveil the regulatory mechanism of tomato quality under salt stress // *Environ. Exp. Bot.* 2020. V. 177. P. 104145.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104145>
41. *Zhang L., Xu Y., Yao H., Xie L., Yang P.* Boronic acid functionalized core–satellite composite nanoparticles for advanced enrichment of glycopeptides and glycoproteins // *Chem. Eur. J.* 2009. V. 15. P. 10158.
<https://doi.org/10.1002/chem.200901347>
42. *Beihammer G., Romero-Pérez A., Maresch D., Figl R., Mócsai R., Grünwald-Gruber C., Altmann F., Van Damme E.J.M., Strasser R.* *Pseudomonas syringae* DC3000 infection increases glucosylated *N*-glycans in *Arabidopsis thaliana* // *Glycoconjugate. J.* 2023. V. 40. P. 97.
<https://doi.org/10.1007/s10719-022-10084-6>
43. *Trempel F., Kajiura H., Ranf S., Grimmer J., Westphal L., Zipfel C., Scheel D., Fujiyama K., Lee J.* Altered glycosylation of exported proteins, including surface immune receptors, compromises calcium and downstream signaling responses to microbe-associated molecular patterns in *Arabidopsis thaliana* // *BMC Plant Biol.* 2016. V. 16. P. 31.
<https://doi.org/10.1186/s12870-016-0718-3>
44. *Haweker H., Rips S., Koiwa H., Salomon S., Saijo Y., Chinchilla D., Robatzek S., von Schaewen A.* Pattern recognition receptors require *N*-glycosylation to mediate plant immunity // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 4629.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.063073>
45. *Joshi R., Paul M., Kumar A., Pandey D.* Role of calreticulin in biotic and abiotic stress signalling and tolerance mechanisms in plants // *Gene.* 2019. V. 714. P. 144004.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144004>
46. *Matsukawa M., Shibata Y., Ohtsu M., Mizutani A., Mori H., Wang P., Ojika M., Kawakita K., Takemoto D.* *Nicotiana benthamiana* calreticulin in 3a is required for the ethylene mediated production of phytoalexins and disease resistance against oomycete pathogen *Phytophthora infestans* // *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2013. V. 26. P. 880.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-12-12-0301-R>
47. *Takano S., Matsuda S., Funabiki A., Furukawa J., Yamauchi T., Tokui Y., Nakazono M., Shinohara Y., Takamure I., Kato K.* The rice RCN11 gene encodes β 1,2-xylosyltransferase and is required for plant responses to abiotic stresses and phytohormones // *Plant Sci.* 2015. V. 236. P. 75.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.03.022>
48. *Veit C., König J., Altmann F., Strasser R.* Processing of the terminal α -1,2-linked mannose residues from oligomannosidic *N*-glycans is critical for proper root growth // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9. P. 1807.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01807>
49. *Liu C., Niu G., Zhang H., Sun Y., Sun S., Yu F., Lu S., Yang Y., Li J., Hong Z.* Trimming of *N*-glycans by the Golgi-localized α -1,2-mannosidases, MNS1 and MNS2, is crucial for maintaining RSW2 protein abundance during salt stress in *Arabidopsis* // *Mol. Plant.* 2018. V. 11. P. 678.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.01.006>
50. *Sturm A., Van Kuik J.A., Vliegenter J.F., Christeels M.J.* Structure, position, and biosynthesis of the high mannose and the complex oligosaccharide side chains of the bean storage protein phaseolin // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. P. 13392.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)76439-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)76439-4)
51. *Kajiura H., Hiwasa-Tanase K., Ezura H., Fujiyama K.* Effect of fruit maturation on *N*-glycosylation of plant-derived native and recombinant miraculin // *Plant Physiol. Biochem.* 2022. V. 178. P. 70.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.02.026>
52. *Rips S., Bentley N., Jeong I.S., Welch J.L., von Schaewen A., Koiwa H.* Multiple *N*-glycans cooperate in the subcellular targeting and functioning of *Arabidopsis* KORRIGAN1 // *Plant Cell.* 2014. V. 26. P. 3792.
<https://doi.org/10.1105/tpc.114.129718>
53. *Rubin E., Ben-Dor S., Sharon N.* Biases and complex patterns in the residues flanking protein *N*-glycosylation site // *Glycobiology.* 2004. V. 14. P. 95.
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwh004>
54. *Dwek R.A.* Glycobiology: towards understanding the function of sugars // *Chem. Rev.* 1996. V. 96. P. 683.
<https://doi.org/10.1021/cr940283b>
55. *Petrescu A.J., Milac A.L., Petrescu S.M., Dwek R.A., Wormald M.R.* Statistical analysis of the protein environment of *N*-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding // *Glycobiology.* 2004. V. 14. P. 103.
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwh008>
56. *Zielinska D.F., Gnad F., Schropp K., Wisniewski J.R., Mann M.* Mapping *N*-glycosylation sites across seven evolutionarily distant species reveals a divergent substrate proteome despite a common core machinery // *Mol. Cell.* 2012. V. 46. P. 542.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.04.031>
57. *Zielinska D.F., Gnad F., Wisniewski J.R., Mann M.* Precision mapping of an *in vivo* *N*-glycoproteome reveals rigid topological and sequence constraints // *Cell.* 2010. V. 141. P. 897.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.012>
58. *Hofbauer A., Stoger E.* Subcellular accumulation and modification of pharmaceutical proteins in different plant tissues // *Curr. Pharm. Des.* 2013. V. 19. P. 5495.
<https://doi.org/10.2174/1381612811319310005>
59. *Ko K., Ahn M.-H., Song M., Choo Y.-K., Kim H.S., Ko K., Joung H.* Glyco-engineering of biotherapeutic proteins in plants // *Mol. Cells.* 2008. V. 25. P. 494.

60. *Montero-Morales L., Steinkellner H.* Advanced plant-based glycan engineering // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2018. V. 6. P. 81.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00081>
61. *Dammen-Brower K., Epler P., Zhu S., Bernstein Z.J., Stabach P.R., Braddock D.T., Spangler J.B., Yarema K.J.* Strategies for glycoengineering therapeutic proteins // *Front. Chem.* 2022. V. 10. P. 863118.
<https://doi.org/10.3389/fchem.2022.863118>
62. *Fang Z., Qin H., Mao J., Wang Z., Zhang N., Wang Y., Liu L., Nie Y., Dong M., Ye M.* Glyco-Decipher enables glycan database-independent peptide matching and in-depth characterization of site-specific N-glycosylation // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. P. 1900.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-29530-y>
63. *Haslam S.M., Freedberg D.I., Mulloy B., Dell A., Stanley P., Prestegard J.H.* Structural analysis of glycans // *Essentials of Glycobiology* [Internet] 4th ed./ Eds. A. Varki et al. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2022. Chapter 50.
64. *Pedrazzini E., Caprera A., Fojadelli I., Stella A., Rocchetti A., Bassin B., Martinoia E., Vitale A.* The *Arabidopsis* tonoplast is almost devoid of glycoproteins with complex N-glycans, unlike the rat lysosomal membrane // *J. Exp. Bot.* 2016. V. 67. P. 1769.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erv567>
65. *Elbers I.J., Stoop G.M., Bakker H., Stevens L.H., Bardor M., Molthoff J.W., Jordi W.J., Bosch D., Lommen A.* Influence of growth conditions and developmental stage on N-glycan heterogeneity of transgenic immunoglobulin G and endogenous proteins in tobacco leaves // *Plant Physiol.* 2001. V. 126. P. 1314.
<https://doi.org/10.1104/pp.126.3.1314>
66. *Lim C.-Y., Lee K.J., Oh D.-B., Ko K.* Effect of the developmental stage and tissue position on the expression and glycosylation of recombinant glycoprotein GA733-FcK in transgenic plants // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 5. P. 2014.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00778>
67. *Arcalis E., Stadlmann J., Marcel S., Drakakaki G., Winter V., Rodriguez J., Fischer R., Altmann F., Stoger E.* The changing fate of a secretory glycoprotein in developing maize endosperm // *Plant Physiol.* 2010. V. 153. P. 693.
<https://doi.org/10.1104/pp.109.152363>
68. *Pedersen C.T., Loke I., Lorentzen A., Wolf S., Kamble M., Kristensen S.K., Munch D., Radutoiu S., Spillner E., Roepstorff P., Thaysen-Andersen M., Stougaard J., Dam S.* N-glycan maturation mutants in *Lotus japonicus* for basic and applied glycoprotein research // *Plant J.* 2017. V. 91. P. 394.
<https://doi.org/10.1111/tpj.13570>
69. *Shin Y.J., Castilho A., Dicker M., Sadio F., Vavra U., Grunwald-Gruber C., Kwon T.H., Altmann F., Steinkellner H., Strasser R.* Reduced paucimannosidic N-glycan formation by suppression of a specific beta-hexosaminidase from *Nicotiana benthamiana* // *Plant Biotechnol. J.* 2017. V. 15. P. 197.
<https://doi.org/10.1111/pbi.12602>
70. *Lattova E., Brabcova A., Bartova V., Potesil D., Bartta J., Zdrahal Z.* N-glycome profiling of patatins from different potato species of *Solanum* genus // *J. Agric. Food Chem.* 2015. V. 63. P. 3243.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00426>
71. *Leonard R., Kolarisch D., Paschinger K., Altmann F., Wilson I.B.H.* A genetic and structural analysis of the N-glycosylation capabilities of rice and other monocotyledons // *Plant Mol. Biol.* 2004. V. 55. P. 631.
<https://doi.org/10.1007/s11103-004-1558-3>
72. *Wilson I., Zeleny R., Kolarich D., Staudacher E., Stroop C., Kamberling J., Altmann F.* Analysis of Asn-linked glycans from vegetable foodstuffs: widespread occurrence of Lewis a, core α 1,3-linked fucose and xylose substitutions // *Glycobiology.* 2001. V. 11. P. 261.
<https://doi.org/10.1093/glycob/11.4.261>
73. *Karki U., Fang H., Guo W., Unnold-Cofre C., Xu J.* Cellular engineering of plant cells for improved therapeutic protein production // *Plant Cell Rep.* 2021. V. 40. P. 1087.
<https://doi.org/10.1007/s00299-021-02693-6>
74. *Van Beers M.M.C., Bardor M.* Minimizing immunogenicity of biopharmaceuticals by controlling critical quality attributes of proteins // *Biotechnol. J.* 2012. V. 7. P. 1473.
<http://dx.doi.org/10.1002/biot.201200065>
75. *De Coninck T., Gistelinc K., Janse van Rensburg H.C., Van den Ende W., Van Damme E.J.M.* Sweet modifications modulate plant development // *Biomolecules.* 2021. V. 11. P. 756.
<https://doi.org/10.3390/biom11050756>
76. *Qin C., Li Y., Gan J., Wang W., Zhang H., Liu Y., Wu P.* OsDGL1, a homolog of an oligosaccharyltransferase complex subunit, is involved in N-glycosylation and root development in rice // *Plant Cell Physiol.* 2013. V. 54. P. 129.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcs159>
77. *Lerouxel O., Mouille G., Andeme-Onzighi C., Bruyant M.-P., Seveno M., Loutelier-Bourhis C., Driouich A., Hofte H., Lerouge P.* Mutants in DEFECTIVE GLYCOSYLATION, an *Arabidopsis* homolog of an oligosaccharyltransferase complex subunit, show protein under glycosylation and defects in cell differentiation and growth // *Plant J.* 2005. V. 42. P. 455.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02392.x>
78. *Wang S.K., Xu Y.X., Li Z.L., Zhang S.N., Lim J.-M., Lee K.O., Li C.Y., Qian Q., Jiang D.A., Qi Y.H.* OsMOGS is required for N-glycan formation and auxin-mediated root development in rice (*Oryza sativa* L.) // *Plant J.* 2014. V. 78. P. 632.
<https://doi.org/10.1111/tpj.12497>
79. *Gillmor C.S., Poindexter P., Lorieau J., Palcic M.M., Somerville C.* α -Glucosidase I is required for cellulose biosynthesis and morphogenesis in *Arabidopsis* // *J. Cell Biol.* 2002. V. 156. P. 1003.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200111093>
80. *Limkul J., Iizuka S., Sato Y., Misaki R., Ohashi T., Fujiyama K.* The production of human glucocerebrosidase in glyco-engineered *Nicotiana benthamiana*

- plants // Plant Biotechnol. J. 2016. V. 14. P. 1682.
<https://doi.org/10.1111/pbi.12529>
81. Strasser R., Stadlmann J., Schähs M., Stiegler G., Quendler H., Mach L., Glössl J., Weterings K., Pabst M., Steinkellner H. Generation of glyco-engineered *Nicotiana benthamiana* for the production of monoclonal antibodies with a homogeneous human-like N-glycan structure // Plant Biotechnol. J. 2008. V. 6. P. 392.
<https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00330.x>
 82. Rozov S.M., Permyakova N.V., Deineko E.V. Main strategies of plant expression system glycoengineering for producing humanized recombinant pharmaceutical proteins // Biochemistry (Moscow). 2018. V. 83. P. 215.
 83. Gerszberg A., Hnatuszko-Konka K. Compendium on food crop plants as a platform for pharmaceutical protein production // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 3236.
<https://doi.org/10.3390/ijms23063236>
 84. Margolin E., Verbeek M., de Moor W., Chapman R., Meyers A., Schäfer G., Williamson A-L., Rybicki E. Investigating constraints along the plant secretory pathway to improve production of a SARS-CoV-2 spike vaccine candidate // Front. Plant Sci. 2022. V. 12. P. 798822.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.798822>
 85. Shin Y.-J., König-Beihammer J., Vavra U., Schweska J., Kienzl N.F., Klausberger M., Laurent E., Grunwald-Gruber C., Vierlinger K., Hofner M., Margolin E., Weinhäusel A., Stöger E., Mach L., Strasser R. N-glycosylation of the SARS-CoV-2 receptor binding domain is important for functional expression in plants // Front. Plant Sci. 2021. V. 12. P. 689104.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.689104>
 86. Liu H., Timko M.P. Improving protein quantity and quality – the next level of plant molecular farming // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 1326.
<https://doi.org/10.3390/ijms23031326>
 87. Parsons J., Altmann F., Arrenberg C.K., Koprivova A., Beike A.K., Stemmer C., Gorr G., Reski R., Decker E.L. Moss-based production of asialo-erythropoietin devoid of Lewis A and other plant-typical carbohydrate determinants // Plant Biotechnol. J. 2002. V. 10. P. 851.
<https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2012.00704.x>
 88. Castilho A., Gattinger P., Grass J., Jez J., Pabst M., Altmann F., Gorfer M., Strasser R., Steinkellner H. N-glycosylation engineering of plants for the biosynthesis of glycoproteins with bisected and branched complex N-glycans // Glycobiology. 2011. V. 21. P. 813.
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwr009>
 89. Nagels B., Van Damme E. J., Pabst M., Callewaert N., Weterings K. Production of complex multiantennary N-glycans in *Nicotiana benthamiana* plants // Plant Physiol. 2011. V. 155. P. 1103.
<https://doi.org/10.1104/pp.110.168773>
 90. Schneider J., Castilho A., Pabst M., Altmann F., Gruber C., Strasser R., Gattinger P., Seifert G.J., Steinkellner H. Characterization of plants expressing the human beta1,4-galactosyltransferase gene // Plant Physiol. Biochem. 2015. V. 92. P. 39.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.04.010>
 91. Kallolimath S., Castilho A., Strasser R., Grunwald-Gruber C., Altmann F., Strubl S., Galuska C.E., Zlatina K., Galuska S.P., Werner S., Thiesler H., Werneburg S., Hildebrandt H., Gerardy-Schahn R., Steinkellner H. Engineering of complex protein sialylation in plants // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2016. V. 113. P. 9498.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1604371113>
 92. Esqueda A., Chen Q. Producing biologics with defined N-glycosylation in plants // Chemokine-glycosaminoglycan interactions: methods and protocols / Ed. Lucas A.R. Humana Press. 2023. V. 2597. P. 235.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2835-5_17
 93. Fang P., Ji Y., Oellerich T., Urlaub H., Pan K.-T. Strategies for proteome-wide quantification of glycosylation macro- and micro-heterogeneity // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 1609.
<https://doi.org/10.3390/ijms23031609>
 94. Jeong I.S., Lee S., Bonkhofer F., Tolley J., Fukudome A., Nagashima Y., May K., Rips S., Lee S.Y., Gallois P., Russell W.K., Jung H.S., von Schaewen A., Koiwa H. Purification and characterization of *Arabidopsis thaliana* oligosaccharyltransferase complexes from the native host: a protein super-expression system for structural studies // Plant J. 2018. V. 94. P. 131.
<https://doi.org/10.1111/tpj.13847>
 95. Castilho A., Beihammer G., Pfeiffer C., Goritzner K., Montero-Morales L., Vavra U., Maresch D., Grunwald-Gruber C., Altmann F., Steinkellner H., Strasser R. An oligosaccharyl transferase from *Leishmania major* increases the N-glycan occupancy on recombinant glycoproteins produced in *Nicotiana benthamiana* // Plant Biotechnol. J. 2018. V. 16. P. 1700.
<https://doi.org/10.1111/pbi.12906>
 96. Vamvaka E., Twyman R.M., Murad A.M., Melnik S., Teh A.Y., Arcalis E., Altmann F., Stoger E., Rech E., Ma J.K., Christou P., Capell T. Rice endosperm produces an underglycosylated and potent form of the HIV-neutralizing monoclonal antibody 2G12 // Plant Biotechnol. J. 2016. V. 14. P. 97.
<https://doi.org/10.1111/pbi.12360>
 97. Shen J.S., Busch A., Day T.S., Meng X.L., Yu C.I., Dabrowska-Schlepp P., Fode B., Niederkrüger H., Forini S., Chen S., Schiffmann R., Frischmuth T., Schaaf A. Mannose receptor-mediated delivery of moss-made α -galactosidase A efficiently corrects enzyme deficiency in Fabry mice // J. Inher. Metab. Dis. 2016. V. 39. P. 293.
<https://doi.org/10.1007/s10545-015-9886-9>
 98. Sariyatun R., Kajiura H., Limkul J., Misaki R., Fujiyama K. Analysis of N-glycan profile of *Arabidopsis alg3* cell culture // Plant Biotechnol. 2021. V. 38. P. 463.
<https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.21.1025a>
 99. Margolin E., Oh Y.J., Verbeek M., Naude J., Pöndorf D., Meshcheriakova Y.A., Peyret H., van

- Diepen M.T., Chapman R., Meyers A.E., Lomonosoff G.P., Matoba N., Williamson A.L., Rybicki E.P.* Co-expression of human calreticulin significantly improves the production of HIV gp140 and other viral glycoproteins in plants // *Plant Biotechnol. J.* 2020. V. 18. P. 2109.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13369>
100. *Ruiz-May E., Thannhauser T.W., Zhang S., Rose J.K.C.* Analytical technologies for identification and characterization of the plant *N*-glycoproteome // *Front. Plant Sci.* 2012. V. 3. P. 150.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00150>
101. *Qin Sh., Qin S., Tian Z.* Progresses in mass spectrometry-based plant N-glycomics and N-glycoproteomics // *Int. J. Mass Spectrom.* 2022. V. 481. P. 116917.
<https://doi.org/10.1016/j.ijms.2022.116917>
102. *Trbojevic-Akmacic I., Lageveen-Kammeijer G.S.M., Heijs B., Petrovic T., Deris H., Wuhler M., Lauc G.* High-throughput glycomic methods // *Chem. Rev.* 2022. V. 122. P. 15865.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c01031>

УДК 581.1

АЛЬФА- И БЕТА-ЭКСПАНСИНЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕСЯ В РАЗЛИЧНЫХ ЗОНАХ РАСТУЩЕГО КОРНЯ КУКУРУЗЫ¹

© 2024 г. Т. А. Горшкова^{a,*}, Н. В. Шилова^b, Л. В. Козлова^{a,c}, О. В. Горшков^a,
А. Р. Назипова^a, А. Р. Агълямова^a, С. М. Полякова^b, А. Ю. Нокель^b, В. В. Головченко^d,
П. В. Микшина^a, О. А. Патова^d, Н. В. Бовин^b

^aКазанский институт биохимии и биофизики Федерального исследовательского центра
“Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия

^bГНЦ Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова
Российской академии наук, Москва, Россия

^cЛаборатория механики и гражданской инженерии, Университет Монпелье,
Национальный центр научных исследований, Монпелье, Франция

^dИнститут физиологии Федерального исследовательского центра Коми научного центра
Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар, Россия

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

Поступила в редакцию 31.08.2023 г.

После доработки 03.10.2023 г.

Принята к публикации 10.10.2023 г.

Экспансины — низкомолекулярные белки, играющие ключевую роль в модификации структуры клеточной стенки в ходе различных физиологических процессов, в частности роста клеток растяжением. Экспансины кодируются большим мультигенным семейством и подразделяются на четыре подсемейства, основными из которых являются альфа- и бета-экспансины; последние получили особое развитие у злаков. Считается, что экспансины модифицируют взаимодействия целлюлозы с ксилоглюканом (альфа-экспансины) или с арабиноксиланом (бета-экспансины). При этом экспансины не обладают каталитической активностью, конкретный механизм их действия неясен, непонятно физиологическое значение столь большого разнообразия изоформ. Для изучения характера экспрессии отдельных экспансинов мы провели транскриптомный анализ всех идентифицированных в геноме кукурузы генов экспансинов, используя удобную модельную систему — зоны растущего первичного корня кукурузы, различающиеся по стадии развития клеток и составу их клеточных стенок. Из 91 гена экспансинов кукурузы в корне экспрессировались 67, причем для большинства генов экспансинов был характерен узкий диапазон зон с максимальным уровнем транскриптов. С применением сконструированного гликоэрея, содержащего 183 полисахарида из клеточных стенок растений различных видов, показано, что рекомбинантные экспансины AtEXPA1 и AtEXPV1 способны связываться с арабиногалактанами и рамногалактуронами I и рядом других полисахаридов клеточных стенок, что расширяет список их потенциальных углеводных мишеней. Продемонстрированы различия в специфичности взаимодействия альфа- и бета-экспансинов с различными полисахаридами, как в количественном, так и в качественном отношении. Выдвинута гипотеза, что многочисленность экспансинов в одном растительном организме и тонкая регуляция их экспрессии объясняются, по крайней мере отчасти, спецификой связывания индивидуальных экспансинов с конкретными полисахаридами клеточной стенки.

Ключевые слова: Zea mays, гликоэрей, клеточная стенка, корень, полисахариды, транскриптомика, экспансины

DOI: 10.31857/S0015330324020043, EDN: OBUMQA

ВВЕДЕНИЕ

Современные представления о механизмах роста растяжением клеток растений — важнейшего морфогенетического процесса в развитии растительного организма — рассматривают в ка-

честве ключевых молекулярных игроков экспансины — белки клеточной стенки, которые за счет непонятого пока механизма способны увеличивать растяжимость клеточной стенки [1]. Так, при локальной индукции в апикальной меристеме гена экспансина происходит увеличение растяжимости ткани в месте воздействия, изменение филлотаксиса и формирование ново-

¹ Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: 10.31857/S0015330324020043

го листа в “неположенном” месте [2]. Известно также, что некоторые альфа-экспансины особенно активно экспрессируются в тех органах и тканях, которые приступают к активному росту [3]. Множество других примеров участия отдельных изоформ экспансинов в морфогенезе растений могут быть найдены в недавнем обзоре М. Samalova с соавт. [4]. При этом у экспансинов не выявлена гидролитическая активность; они не изменяют ковалентную структуру полимеров и, как правило, не снижают прочность клеточной стенки [1, 5].

Экспансины — низкомолекулярные (около 27 кДа) белки — кодируются в геномах различных растений большими мультигенными семействами, насчитывающими многие десятки генов, и подразделяются на два основных подсемейства — альфа- и бета-экспансины, которые обозначаются, соответственно, EXPA и EXPB, а также менее представленные экспансин-подобные белки — EXLA и EXLB [6, 7]. Оба основных подсемейства представлены во всех проанализированных таксонах наземных растений; бета-экспансины получили особое распространение у злаков [8]. Часть бета-экспансинов известна как аллергены пыльцы злаков; они исключительно высоко экспрессируются и могут составлять 0.1% от сухой массы пыльцы или 4% всего экстрагируемого белка [9]. Другие экспансины присутствуют в клеточной стенке в очень низких количествах; приводятся величины порядка 0.02% от сухой массы клеточной стенки, что в молодых тканях, анализировавшихся в указанной работе, должно составлять тысячные доли процента от общей сухой массы [5].

Экспансины — единственные белковые агенты, способные за секунды увеличивать растяжимость растительных тканей [10]. Более того, эти белки также способны увеличивать растяжимость фильтровальной бумаги — целлюлозного материала, далекого от состояния *in planta* [5]. Считается, что воздействие экспансинов происходит в “горячих точках” — местах, где микрофибриллы целлюлозы находятся в тесном контакте друг с другом, формируя тем самым несущий каркас растительной клеточной стенки [11]. Однако действие экспансинов в клеточной стенке обычно связывают не только с микрофибриллами целлюлозы, но и с конкретными полисахаридами матрикса. В частности, установлено, что действие альфа-экспансинов усиливается при наличии ксилоглюкана [12]. Показано, что бета-экспансины взаимодействуют с глюкуроноарабиноксиланом [13]. При этом, остаются неясными не только непосредственные механизмы действия экспансинов, но и сопряженные вопросы о том, почему экспансинов так много, и с чем связана их выраженная дифференциальная экспрессия.

Появление различных омиксных технологий позволяет провести всеобъемлющий анализ экспрессии генов экспансинов в физиологически отличающихся растительных тканях, а также выявить и оценить особенности связывания альфа- и бета-экспансинов с разнообразными полисахаридами клеточных стенок. Для масштабной характеристики экспрессирующихся экспансинов мы использовали модельную систему первичного корня кукурузы, в котором были выделены пять различных зон, содержащих клетки на последовательных стадиях развития [14, 15]. Для каждой из зон ранее охарактеризованы механические свойства клеточных стенок и набор полисахаридов, а также проанализирована экспрессия генов гликозилтрансфераз и гликозидгидролаз, обеспечивающих формирование и модификацию полисахаридного ансамбля в ходе развития [15–17]. Для изучения способности альфа- и бета-экспансинов к связыванию с компонентами клеточных стенок использован недавно сконструированный нами полисахаридный гликоэrray [18]. Этот подход позволил нам продемонстрировать, что экспансины могут связываться с рамногалактуронами I и арабиногалактанами, и что разные экспансины отличаются по наборам полисахаридов-мишеней. Совокупность полученных данных позволила выдвинуть гипотезу, что многочисленность изоформ экспансинов в одном растительном организме и тонкая регуляция их экспрессии может быть обусловлена спецификой связывания индивидуальных экспансинов с конкретными полисахаридами клеточной стенки, набор которых в свою очередь отличается в разных органах и тканях, а также на разных стадиях развития клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. Исследования проводили на корнях 5-дневных проростков кукурузы (*Zea mays* L.), сорт Машук (Нива Татарстана, Казань, Россия), выращенных в темноте при 27°C. Первичный корень проростка был разделен лезвием на зоны по следующей схеме: корневой чехлик, меристема (0–1 мм, считая от соединения корня с чехликом), зона раннего растяжения (1–2 мм), активного растяжения (2–6 мм) и позднего растяжения (7–10 мм) (рис. 1). Распределение зон соответствует опубликованным ранее работам Kozlova с соавт. [15, 19] и дополнительно верифицировано путем измерения длин клеток коры и ризодермы.

Идентификация генов, кодирующих экспансины, и их филогенетический анализ. Гены экспансинов кукурузы были найдены в базе данных EnsemblPlants (<http://plants.ensembl.org/index>).

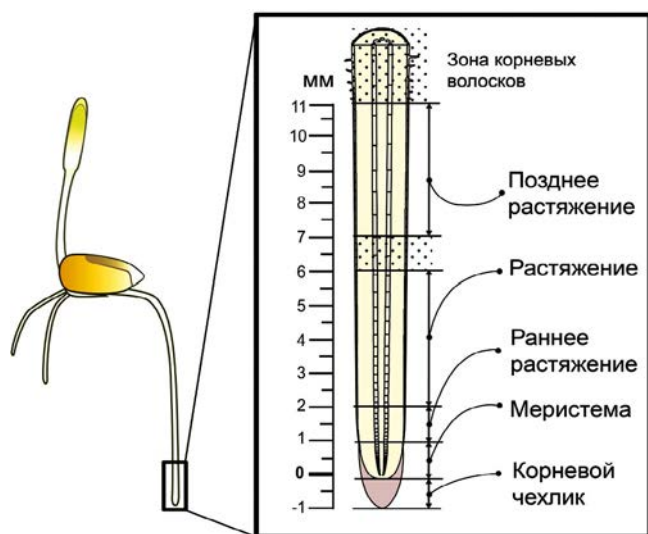


Рис. 1. Схема деления кончика первичного корня 5-дневного проростка кукурузы на зоны для анализа транскриптомов. Точками покрыты зоны корня, которые не использовались для анализа.

html) (дата доступа 20 ноября 2019 г.) и определены по наличию в последовательностях соответствующих белков одновременно двух Pfam доменов (<http://pfam.xfam.org/>): N-концевого домена DPBB (PF03330) и C-концевого бета-сэндвич домена CBM63 (PF01357) [20–22]. Гены экспансинов риса (*Oryza sativa* L., японская группа) и резуховидки Таля (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), использованные для сопоставления, были найдены в базе данных Phytozome12.1 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) (дата доступа 20 ноября 2019 г.) также по наличию двух доменов, характерных для экспансинов [23].

Аминокислотные последовательности, кодируемые выявленными генами экспансинов, подвергали множественному выравниванию алгоритмом Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) [24]. Полученное выравнивание подвергли филогенетическому анализу методом максимального подобия в программе IQ-TREE 1.6.9 [25]. Расчет наиболее подходящей модели эволюции последовательности выполнялся с помощью функции ModelFinder (IQ-TREE 1.6.9) [26]. Наиболее подходящая модель имела самое низкое значение байесовского информационного критерия. Статистическая достоверность выделения ветвей была рассчитана с помощью алгоритма сверхбыстрой аппроксимации филогенетического бутстрепа с использованием 10000 повторов [27]. Дендрограмма была визуализирована с помощью веб-сервиса iTOL 5.3 (<https://itol.embl.de/>), затем отредактирована в графическом редакторе Adobe Illustrator CC 2017 (“Adobe Systems”, США) [28].

Транскриптомный анализ экспрессии генов экспансинов в различных зонах растущего корня кукурузы. Библиотеки мРНК из пяти зон первичного корня кукурузы в четырех повторностях каждая были секвенированы с использованием платформы Illumina NovaSeq 6000 в режиме парноконцевого прочтения с длиной ряда 150 нуклеотидов на базе Novogene Corporation (Китай, <https://en.novogene.com/>) и размещены в системе SRA (Sequence Read Archive) в виде данных BioProject с идентификатором PRJNA639682 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=PRJNA639682>). После контроля качества парных прочтений отфильтрованные пулы ридов (короткие последовательности ДНК) каждого образца были картированы на геном кукурузы (версия сборки генома кукурузы B73 RefGen_v4, загружена из базы данных Gramene (https://ensembl.gramene.org/Zea_mays/Info/Index) с использованием программы HISAT2 v2.1 [29]. Для подсчета количества прочтений, выровненных на каждый ген, использовали алгоритм Stringtie v2.0 [30]. Нормализацию значений уровня экспрессии генов проводили с использованием пакета DESeq2 в программной среде R (<https://www.R-project.org/>) [31]. Ген считался экспрессируемым, если среднее (по повторностям) нормализованное значение TGR (total gene reads; общее число прочтений, приходящихся на ген) хотя бы в одном образце было больше или равнялось 16, в соответствии с рекомендациями [32].

Рекомбинантные экспансины, использованные для оценки их связывания с полисахаридами клеточных стенок с помощью гликоэкреев и твердофазного иммуоферментного анализа. Для сопоставления характера связывания альфа- и бета-экспансинов с полисахаридами клеточной стенки использовали коммерчески доступные рекомбинантные белки *Arabidopsis thaliana* (“MyBioSource”, США): MBS1412737 — Expansin-A1 (EXPA1) как альфа-экспансин и MBS1443426 — Expansin-B1 (EXPB1) как бета-экспансин. Использованный для анализа альфа-экспансин (UniProt# Q9C554, TAIR# At1g69530, мол. массой 26518 Да) экспрессирован в дрожжах, имеет 10xHis-tag на N-конце и Myc-tag на C-конце; бета-экспансин (UniProt# Q9SKU2, TAIR# At2g20750, MW 29108 Da) экспрессирован в *E. coli*, имеет 6xHis-tag на N-конце. При дальнейшем изложении в статье они обозначаются соответственно AtEXPA1 и AtEXPB1.

Для проверки чистоты препаратов проводили электрофорез на 12% полиакриламидном геле с последующим иммуоблоттингом с антителами мыши, узнающими гистициновую метку (“Bio Rad”, США) (разведение 1 : 5000), и антителами козы, конъюгированными с перок-

сидазой хрена и узнающими иммуноглобулины мыши (“Abscam”, Великобритания) (разведение 1 : 10000). Визуализация полос осуществлялась за счет окисления пероксидазой хемилюминесцентного субстрата люминола в присутствии перекиси и кумаровой кислоты. Результирующая хемилюминесценция детектировалась в системе визуализации ChemiDoc (“Bio Rad”, США).

Гликоэррей для характеристики связывания экспансинов с полисахаридами клеточной стенки растений. Гликоэррей, содержащий 183 полисахарида клеточных стенок растений, а также 29 моно- и олигосахаридов — компонентов использованных полисахаридов и/или типичных лигандов известных растительных лектинов, был напечатан в формате гликочипа как описано у А. Никифоровой с соавт. [18] с использованием эпокси-активированных слайдов СЕМИ-ГЛАС-Эпокси (“Семиотик”, Россия). Каждый лиганд был напечатан в 9 повторах. Полный список лигандов и их характеристика приведены в Дополнительных материалах (Дополнительные материалы, табл. S1). Гликочипы инкубировали в буфере для блокировки (50 мМ этаноламина (“Sigma-Aldrich”, США), 150 мМ борной кислоты (“Люми”, Россия, <https://lumi.spb.ru>), 0.2% (об/об) Tween 20 (“Sigma-Aldrich”, США), pH 8.5) в течение 120 мин при постоянном помешивании при комнатной температуре, после чего два раза промывали фосфатно-солевым буфером (“Эко-Сервис”, Россия), содержащим 0.05% (об/об) Tween 20 (ФСБ — 0.05%). Далее на чипы наносили 1 мл раствора AtEXPA1 или AtEXPB1 с концентрацией 30 мкг/мл в ФСБ — 0.1% и инкубировали 16 ч при 4°C и повышенной влажности. Далее промывали, как описано выше. Затем наносили раствор антител мыши, узнающих His-tag, меченых флуоресцентной меткой Alexa 647 (JacksonImmunoResearch, США), в разведении 1 : 400 в ФСБ — 0.1% и инкубировали 1 ч при 37°C и повышенной влажности. Гликоэррей промывали два раза ФСБ — 0.05% и на конечном этапе — в бидистиллированной воде, а затем высушивали чипы центрифугированием и сканировали (разрешение — 10 мкм) с помощью флуоресцентного ридера InnoScan 1100 AL (“Innopsys”, Франция). Полученные изображения преобразовывали в таблицу Excel с помощью программного обеспечения ScanArray Express 4.0 (“Perkin-Elmer”, США) с использованием метода подстраивающихся колец и GAL-файла. Результаты представляли в виде медианы (по 9 повторам) относительных единиц флуоресценции (RFU), отражающей аффинность и количество углевод-связывающих белков. Сигналы, величины которых были ниже 10% от максимального значения RFU, не рассматривали.

Планшетный твердофазный анализ (пТФА) для ингибиторного анализа связывания отдельных полисахаридов с экспансинами. В лунки 96-луночного планшета вносили по 100 мкл раствора полисахарида № 15106, показавшего в анализе с использованием гликоэррея высокий уровень связывания и с альфа-, и с бета-экспансинами, 1 мкг/мл в Na-карбонатном буфере (pH 9.6) и инкубировали в течение ночи при 4°C, после чего блокировали их 1% бычьим сывороточным альбумином, BSA (“Sigma-Aldrich”, США) в 10 мМ Tris-HCl (“Хеликон”, Россия) pH 7.4 в течение 1 ч при 37°C и промывали трижды 10 мМ Tris-HCl pH 7.4, содержащем 0.05% Tween20 (“ICN”, США). Затем в лунки вносили 50 мкл раствора ингибиторов — полисахаридов, отобранных по результатам гликоэррея, а также на основе литературных данных (полисахариды №№ 15106, 15148, 15058, 15090 и 15165 согласно нумерации в Дополнительных материалах и ранее опубликованной статье, их характеристика дается при изложении результатов) в двукратном разведении в диапазоне от 20 до 0.3 мкг/мл в 0.1 М фосфатно-цитратном буфере, pH 5.0 и прибавляли туда 50 мкл раствора AtEXPA1 или AtEXPB1 в том же буфере, до конечной концентрации 10 мкг/мл, и инкубировали 1 ч при 37°C и промывали [18]. Затем в лунки планшета вносили 100 мкл раствора анти-His-tag-антител мыши в разведении 1 : 5000 в 10 мМ Tris-HCl pH 7.4, содержащем 0.3% BSA, инкубировали 1 ч при 37°C и промывали как описано выше. После чего прибавляли 100 мкл раствора антител козы, узнающих иммуноглобулины мыши, меченые пероксидазой хрена, в разведении 1 : 7000 в 10 мМ Tris-HCl, pH 7.4, содержащем 0.3% BSA, инкубировали 1 ч при 37°C и промывали. Затем в лунки вносили по 100 мкл 0.04% о-фенилендиамина (“Sigma-Aldrich”, США) и 0.03% H₂O₂ в 0.1 М фосфатно-цитратном буфере, pH 5.0 и останавливали реакцию путем добавления в каждую лунку 50 мкл 1 М раствора H₂SO₄ в воде. Поглощение считывали при 492 нм с помощью планшетного ридера Wallac 1420 Victor 2 (“PerkinElmer”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Идентификация генов экспансинов кукурузы и филогенетический анализ последовательностей соответствующих белков. В геноме кукурузы выявлен 91 ген экспансинов — существенно больше, чем в геномах *A. thaliana* (35 генов) и риса (55 генов). Среди них 45 генов относятся к альфа-экспансином, 43 гена — к бета-экспансином и 3 гена представляют собой альфа-экспансин-подобные белки; генов бета-экспансин-подобных белков в геноме кукурузы не выявлено. Количество бета-экспансинов у кукурузы (43) значительно превышает количество бета-экспансинов (6) и

бета-экспансин-подобных белков (3) у *A. thaliana*, вместе взятых. Филогенетический анализ позволил подразделить выявленные последовательности экспансинов кукурузы на подсемейства и клады и соотнести их с таковыми у риса и *A. thaliana* (рис. 2).

На филогенетическом древе экспансинов четко выделялись различные клады, которые обозначены римскими цифрами (рис. 2): альфа-экспансины кукурузы подразделены нами на 14 основных кладов, а бета-экспансины – на 5. В каждой кладе альфа-экспансинов кукурузы присутствовали также альфа-экспансины риса, а подобные белки *A. thaliana* отсутствовали почти в половине кладов (I–V, XIV). Для бета-экспансинов кукурузы характерна большая специфичность: в I–III кладах отсутствовали гомологи из *A. thaliana*, а I и II клады бета-экспансинов кукурузы хорошо отделялись и от генов риса (рис. 2).

Экспрессия генов экспансинов в различных зонах растущего корня кукурузы. Из 91 гена экспансинов кукурузы в корне экспрессировались 67, причем практически все они имели ярко выраженный дифференциальный характер экспрессии в различных зонах корня, отличающихся по стадии развития клеток (рис. 3). Гены экспансинов, занимающие на древе одну кладу, часто имели сходную динамику количества транскриптов по зонам растягивающегося корня (рис. 3). Например, содержание транскриптов практически всех экспрессирующих представителей клады IV бета-экспансинов, как и клады II альфа-экспансинов, были максимальными в зоне активного растяжения, в то время как транскрипты представителей клады V альфа-экспансинов кукурузы, не имеющих гомологов в *A. thaliana* (рис. 2), обнаруживались только в чехлике (рис. 3).

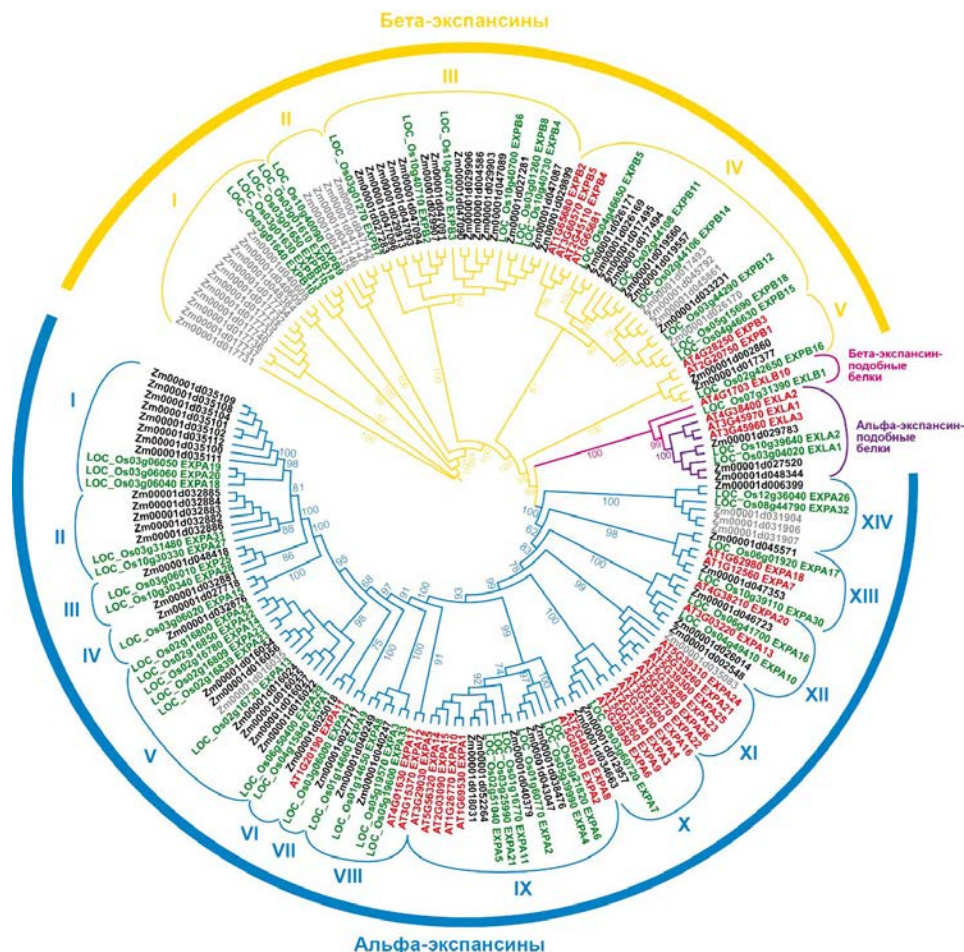


Рис. 2. Филогенетическое древо экспансинов кукурузы (*Zea mays*), резуховидки Таля (*Arabidopsis thaliana*) и риса (*Oryza sativa*). Наименования экспансинов, гены которых экспрессируются в корне кукурузы, обозначены на древе черным шрифтом, а те, гены которых не экспрессируются ($TGR < 16$ во всех образцах) – серым шрифтом. Для резуховидки Таля дополнительно указаны названия экспансинов, предложенные Kende с соавт. [6], для риса – согласно Choi с соавт. [33]. Круглыми скобками и римскими цифрами указаны выделенные нами клады для альфа- и бета-экспансинов кукурузы. Арабскими цифрами указаны индексы сверхбыстрой аппроксимации филогенетического бутстрапа.

Клада	Ген	Чех	Мер	рРаст	Раст	пРаст	Чех	Мер	рРаст	Раст	пРаст
ZmEXPA											
I	Zm00001d035112	0	1	0	289	139	0	0	0	100	48
I	Zm00001d035108	0	1	3	251	43	0	0	1	100	17
I	Zm00001d035109	0	0	2	223	31	0	0	1	100	14
I	Zm00001d035111	0	0	0	175	55	0	0	0	100	31
I	Zm00001d035102	0	0	2	137	28	0	0	1	100	20
I	Zm00001d035101	0	0	2	124	21	0	0	1	100	17
I	Zm00001d035100	0	0	0	92	27	0	0	0	100	29
I	Zm00001d035104	0	0	1	89	17	0	0	1	100	19
II	Zm00001d032886	20	454	1326	1082	35	2	34	100	82	3
II	Zm00001d032883	0	1	24	2048	458	0	0	1	100	22
II	Zm00001d032882	0	14	276	1605	101	0	1	17	100	6
II	Zm00001d032884	0	2	131	1168	224	0	0	11	100	19
II	Zm00001d032885	0	3	182	1095	128	0	0	17	100	12
III	Zm00001d032881	9	379	1714	856	6	1	22	100	50	0
III	Zm00001d048418	0	157	1213	761	2	0	13	100	63	0
IV	Zm00001d032876	31	790	883	38	0	4	90	100	4	0
IV	Zm00001d027718	151	170	63	3	1	89	100	37	2	0
V	Zm00001d016022	755	45	1	3	8	100	6	0	0	1
V	Zm00001d016054	468	32	0	2	1	100	7	0	0	0
V	Zm00001d016024	306	21	1	2	3	100	7	0	1	1
V	Zm00001d047353	315	13	1	0	0	100	4	0	0	0
V	Zm00001d016025	212	15	1	1	3	100	7	1	1	1
V	Zm00001d016027	203	14	1	1	2	100	7	0	1	1
V	Zm00001d016056	115	7	0	0	0	100	6	0	0	0
VI	Zm00001d025018	0	721	5688	2969	142	0	13	100	52	3
VII	Zm00001d027717	1351	1433	561	29	1	94	100	39	2	0
VIII	Zm00001d040249	0	0	37	305	33	0	0	12	100	11
VIII	Zm00001d040247	0	0	4	19	3	0	0	22	100	15
IX	Zm00001d040379	2172	2799	2343	289	28	78	100	84	10	1
IX	Zm00001d038476	183	730	3486	2352	64	5	21	100	67	2
IX	Zm00001d043047	273	657	2793	2524	188	10	24	100	90	7
IX	Zm00001d018031	938	215	22	22	69	100	23	2	2	7
IX	Zm00001d052264	429	198	50	74	193	100	46	12	17	45
X	Zm00001d012957	361	161	202	323	85	100	45	56	89	23
X	Zm00001d034663	56	23	61	171	478	12	5	13	36	100
XII	Zm00001d026014	1221	1696	1663	526	189	72	100	98	31	11
XII	Zm00001d002548	435	696	845	256	82	52	82	100	30	10
XII	Zm00001d046723	77	44	135	778	783	10	6	17	99	100
XIII	Zm00001d045571	0	0	18	109	84	0	0	16	100	77
XIII	Zm00001d047353	0	0	10	29	25	0	0	33	100	85
ZmEXPB											
III	Zm00001d029899	1136	2660	12036	7680	255	9	22	100	64	2
III	Zm00001d027281	387	2728	5183	1181	218	7	53	100	23	4
III	Zm00001d029903	0	9	841	5428	248	0	0	15	100	5
III	Zm00001d047089	34	320	2201	2894	66	1	11	76	100	2
III	Zm00001d047087	527	802	2555	1328	265	21	31	100	52	10
III	Zm00001d047091	203	550	1006	1137	4	18	48	88	100	0
III	Zm00001d027283	176	239	406	748	872	20	27	47	86	100
III	Zm00001d047096	757	556	497	331	51	100	74	66	44	7
III	Zm00001d047093	1151	58	8	8	119	100	5	1	1	10
III	Zm00001d004586	389	233	98	145	214	100	60	25	37	55
III	Zm00001d029906	0	0	7	241	681	0	0	1	35	100
III	Zm00001d029913	13	14	17	133	361	4	4	5	37	100
III	Zm00001d047094	0	0	17	161	98	0	0	11	100	61
III	Zm00001d047090	1	10	43	153	52	1	7	28	100	34
III	Zm00001d029907	0	0	5	36	0	0	0	13	100	0
IV	Zm00001d019560	1	31	2685	9125	1262	0	0	29	100	14
IV	Zm00001d017495	23	23	168	898	238	3	3	19	100	26
IV	Zm00001d017494	0	2	78	894	297	0	0	9	100	33
IV	Zm00001d033231	600	392	120	67	80	100	65	20	11	13
IV	Zm00001d026171	0	16	115	244	4	0	6	47	100	2
IV	Zm00001d019557	0	0	23	92	5	0	0	25	100	6
IV	Zm00001d026169	0	0	7	29	16	0	0	23	100	57
V	Zm00001d017377	21	131	78	34	613	3	21	13	5	100
V	Zm00001d002860	135	100	14	0	23	100	74	10	0	17
ZmEXLA											
-	Zm00001d027520	14	6	11	206	1173	1	1	1	18	100
-	Zm00001d029783	190	74	61	178	360	53	21	17	50	100
-	Zm00001d048344	17	7	11	55	354	5	2	3	16	100

Рис. 3. Уровень транскриптов генов экспансинов, экспрессирующихся ($TGR \geq 16$ хотя бы в одной зоне) в различных зонах корня проростка кукурузы. Гены отсортированы по подсемействам (EXPA – альфа-экспансины, EXPB – бета-экспансины, EXLA – альфа-экспансин-подобные белки), внутри подсемейств – по клладам (обозначены римскими цифрами и соответствуют филогенетическому дереву на рис. 2), а внутри клад – по убыванию суммарных значений TGR во всех образцах. Тепловая карта экспрессии: левая панель – значения TGR; правая панель – относительный уровень экспрессии генов в процентах, где за 100% принято максимальное для каждого гена значение TGR. Чех – чехлик, Мер – меристема, рРаст – ранее растяжение, Раст – активное растяжение, пРаст – позднее растяжение.

В целом, количество транскриптов генов экспансинов было максимальным в зонах инициации растяжения и активного растяжения. Так, число генов со значениями $TGR > 500$ составляло 10–12 в чехлике и меристеме, возрастало до 18–22 в зонах начала и активного растяжения, а в зоне позднего растяжения падало до 6 (рис. 3). Еще нагляднее эта закономерность выявляется при оценке суммарного содержания транскриптов всех высокоэкспрессирующихся ($TGR > 500$) генов экспансинов в каждой зоне: в зонах начала и активного роста растяжением, где скорость роста клеток наибольшая, этот показатель в 3–8 раз выше, чем в других зонах (рис. 3). Наиболее высокие значения содержания транскриптов отмечены для генов бета-экс-пансинов *Zm00001d029899* и *Zm00001d019560* (клады III и IV соответственно), у которых максимумы приходились, соответственно, на зоны начала растяжения и активного растяжения; среди альфа-экс-пансинов наибольший уровень транскриптов был отмечен для *Zm00001d025018* с пиком значений в зоне начала растяжения (рис. 3).

Обращает на себя внимание, что гены, число транскриптов которых резко увеличивалось в зоне начала растяжения по сравнению с чехликом и меристемой, затем часто характеризовались снижением числа транскриптов в зоне наиболее активного роста; например, гены *Zm00001d029899*, *Zm00001d025018* и *Zm00001d038476* (рис. 3). При этом в активно растущих клетках был отмечен максимально высокий уровень транскриптов другого ряда генов, чьи транскрипты были слабо представлены на более ранних стадиях развития клеток, включая начало растяжения. К числу таких генов относились, например, *Zm00001d019560*, *Zm00001d029903* и *Zm00001d032883*. Таким образом, наборы генов экспансинов, активно транскрибируемых при индукции роста растяжением и при его наибольших скоростях, существенно различаются (рис. 3). Эта закономерность имеет более общий характер: для большинства генов экспансинов характерен узкий диапазон зон с максимальным уровнем транскриптов. Так, значения TGR близкие или равные 100% чаще всего наблюдали в одной зоне, иногда в двух, но не более (рис. 3). Следует отметить, что клеточные стенки в различных зонах корня отличаются по набору полисахаридов и механическим свойствам [15, 16].

Ряд генов экспансинов — *Zm00001d027717*, *Zm00001d040379*, *Zm00001d026014* — характеризовался наибольшим уровнем транскриптов в меристематической зоне; все эти гены кодируют альфа-экс-пансины (рис. 3). Транскрипты генов значительной части и альфа-, и бета-экс-пансинов были максимально представлены в чехлике, хотя уровень значений TGR был невысок (рис. 3).

Несмотря на резкое снижение при замедлении роста растяжением общей экспрессии генов, кодирующих экспансины (рис. 3), несколько генов имели в этой зоне максимальную для них представленность транскриптов: *Zm00001d029906*, *Zm00001d034663*, *Zm00001d029913*. Аналогичный паттерн был характерен и для всех трех генов альфа-экс-пансин-подобных белков, в частности, для *Zm00001d027520* (рис. 3).

Примечательно, что не экспрессирующиеся в растущем корне кукурузы гены экспансинов собираются на древе в группы. Например, клады I и II бета-экс-пансинов и одна из частей обширной клады IV, а также клад XI и XIV альфа-экс-пансинов (рис. 2). При этом к не экспрессирующимся в корне относился ген ранее охарактеризованного белка *ZmEXPB1* (*Zm00001d047147*) из клады I, которым исключительно богата пыльца кукурузы [34], а также все его ближайшие гомологи (рис. 2).

Сопоставление способностей альфа- и бета-экс-пансинов связываться с различными полисахаридами клеточной стенки. Для сопоставления способностей альфа- и бета-экс-пансинов связываться с различными полисахаридами клеточной стенки использовали сконструированный ранее гликоэзрей в расширенной версии (Дополнительные материалы, табл. S1) [18]. В качестве альфа- и бета-экс-пансинов использовали коммерческие рекомбинантные белки *AtEXPA1* и *AtEXPB1*. Электрофорез белков с последующим иммуноблоттированием с антителами на гистициновую метку продемонстрировал высокую чистоту препаратов (рис. 4).

Полисахариды, нанесенные на гликоэзрей, представлены, в основном, разнообразными пектиновыми веществами из различных источников, а также некоторыми гемицеллюлозами. В соответствии с характерными элементами

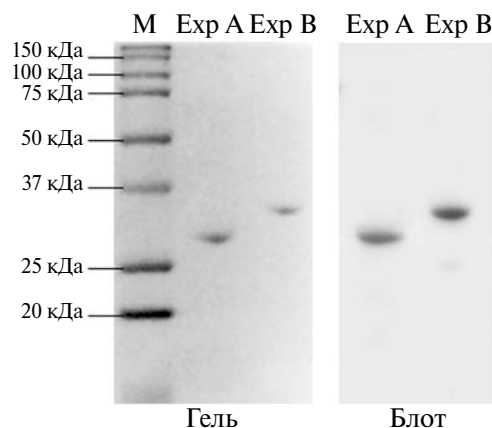


Рис. 4. Оценка чистоты рекомбинантных экспансинов с помощью электрофореза (Гель) с последующим иммуноблоттированием (Блот) с антителами на гистициновую метку.

структуры, все полисахариды подразделены на девять групп (рис. 5). Если использовать пороговую величину в 10% от максимальной для отсечки полисахаридов, не продемонстрировавших взаимодействия, AtEXPA1 взаимодействовал с 85, а AtEXPB1 — с 15 из 183 полисахаридов гликоэррея. Ни один из 29 низкомолекулярных углеводов гликоэррея не показал значимого связывания ни с одним из проанализированных экспансинов (Дополнительные материалы, табл. S1).

Для сопоставления результатов отдельных экспериментов с AtEXPA1 и AtEXPB1 данные представлены в % от максимального значения интенсивности сигнала (RFU) (рис. 5). Максимальные значения RFU в экспериментах с обоими экспансинами были сопоставимы и составляли порядка 8500 единиц (Дополнительные материалы, табл. S1). По результатам связывания с гликоэрреем, проанализированный альфа-экспансин AtEXPA1 взаимодействовал преимущественно с полисахаридами, содержащими Ara или Gal, либо оба моносахарида (т.е. с представителями групп 5–8), а также с полисахаридом из группы 9 — гемицеллюлозой из подсолнечника (рис. 5). Значительно слабее он связывался с рамногалактуронанами с невысокой представленностью боковых цепей (группа 4) и с гомогалактуронанами (группы 1–3). При этом, карбоксильные группы значительной части представленных гомогалактуронанов не были этерифицированы метильными группами (определено для образцов 15011, 15084, 15087, 15088, 15131, 15134).

Максимальное взаимодействие с альфа-экспансином отмечено для полисахаридов 15058 и 15106 (рис. 5). Образец 15058 — арабиногалактан из камеди акации (*Acacia* sp.), имеющий моносахаридный состав Ara 32%, Gal 46%, Rha 11%, GalA 3%, GlcA 8% (Дополнительные материалы, табл. S1). Образец 15106 — арабиногалактан из зелени пихты сибирской (*Abies sibirica* Ldb.) (Ara 29%, Gal 33%, Rha 2%, UA 30%, белок 8%). Арабиногалактаны обоих образцов относятся ко II типу, в котором остатки галактозы присутствуют в виде 1,3- и 1,6-β-D-Galp, а не 1,4-β-D-Galp, как у арабиногалактанов I типа. Основная высокоразветвленная цепь в полисахаридах 15058 и 15106 состоит из 1,3-β-D-Galp. Боковые цепи преимущественно представлены остатками 1,6-β-D-Galp, присоединенными к главной углеводной цепи по O-6 положению. В качестве терминальных остатков на концах галактановых цепей могут располагаться α-L-Araf, β-L-Arap, α-L-Rhap, β-D-GlcA и 4-O-метил-β-D-GlcA [35].

С полисахаридом 15106 активно взаимодействовал и бета-экспансин, AtEXPB1, для которого наиболее выраженным было связывание с

полимерами из группы 4, в частности, с полисахаридом 15090 (GalA 57%, Rha 26%, Gal 9%, Ara 3%), выделенным из листьев березы пушистой (*Betula alba* L.). Главным компонентом этого образца является рамногалактуронан I с остатками Rhap замещенными по O-4 единичными остатками D-Galp [36].

AtEXPB1 взаимодействовал с полисахаридами, имеющими в своем составе рамногалактуронан I (группы 3 и 4), Ara и Gal (группы 5–7), а также с гемицеллюлозой 15180 (группа 9) из подсолнечника, которая, судя по моносахаридному составу (GalA 13%, GlcA < 1%, Rha 4%, Ara 13%, Xyl 63%, Glc 2%, Gal 5%), является глюкуроноарабиноксиланом; этот полимер взаимодействовал и с AtEXPA1 (рис. 5). Из полисахаридов этой группы взаимодействие с экспансином AtEXPA1 продемонстрировал также образец 15051 из сахарной свеклы с высокой долей глюкозы (UA 3%, Rha 3%, Ara 26%, Glc 54%, Gal 13%) (рис. 5). Этот образец не окрашивался йодом (данные не приведены), т.е. не содержал примеси крахмала — альфа-глюкана, не присутствующего в клеточной стенке. Пограничное значение по интенсивности взаимодействия с AtEXPA1 было выявлено для глюкуроноксилана 15191 из древесины бука (*Fagus* sp. L.) (GalA 1%, GlcA < 1%, Xyl 97%, Gal 2%). Остальные гемицеллюлозы гликоэррея, включая галактоманнан из камеди рожкового дерева (*Ceratonia siliqua*) (15153) (UA 6%, Gal 20%, Man 74%), ксилоглюкан из семян тамаринда (*Tamarindus indica*) (15148) (UA 7%, Ara 2%, Xyl 31%, Glc 45%, Gal 15%) и бета-глюкан со смешанным типом связи из ячменя (*Hordeum* sp.) (15116) (Ara 1%, Xyl 2%, Glc 97%), не показали значимого связывания (Дополнительные материалы, табл. S1).

Чтобы подтвердить специфичность взаимодействия экспансинов с полисахаридами был проведен планшетный твердофазный анализ (пТФА) в ингибиторном варианте. В качестве основного (для нанесения на подложку) взяли полисахарид 15106 (группа 5, арабиногалактан из зелени пихты сибирской), имеющий, по данным гликоэррея, высокий сигнал как для AtEXPA1, так и для AtEXPB1 (рис. 5). Взаимодействие исследуемых белков с полисахаридом 15106 было оценено в прямом пТФА в диапазоне концентраций полисахарида 0.07–5.00 мкг/мл (данные не показаны), и в качестве оптимальной была выбрана концентрация 1 мкг/мл.

По результатам ингибиторного анализа взаимодействие альфа- и бета-экспансинов с полисахаридом 15106 было подтверждено — концентрация 50% ингибирования (IC50) составила 0.80 и 0.65 мкг/мл соответственно (рис. 6). В качестве ингибиторов, помимо самого образца 15106, были выбраны охарактеризованные выше полисахариды 15058 (арабиногалактан акации)

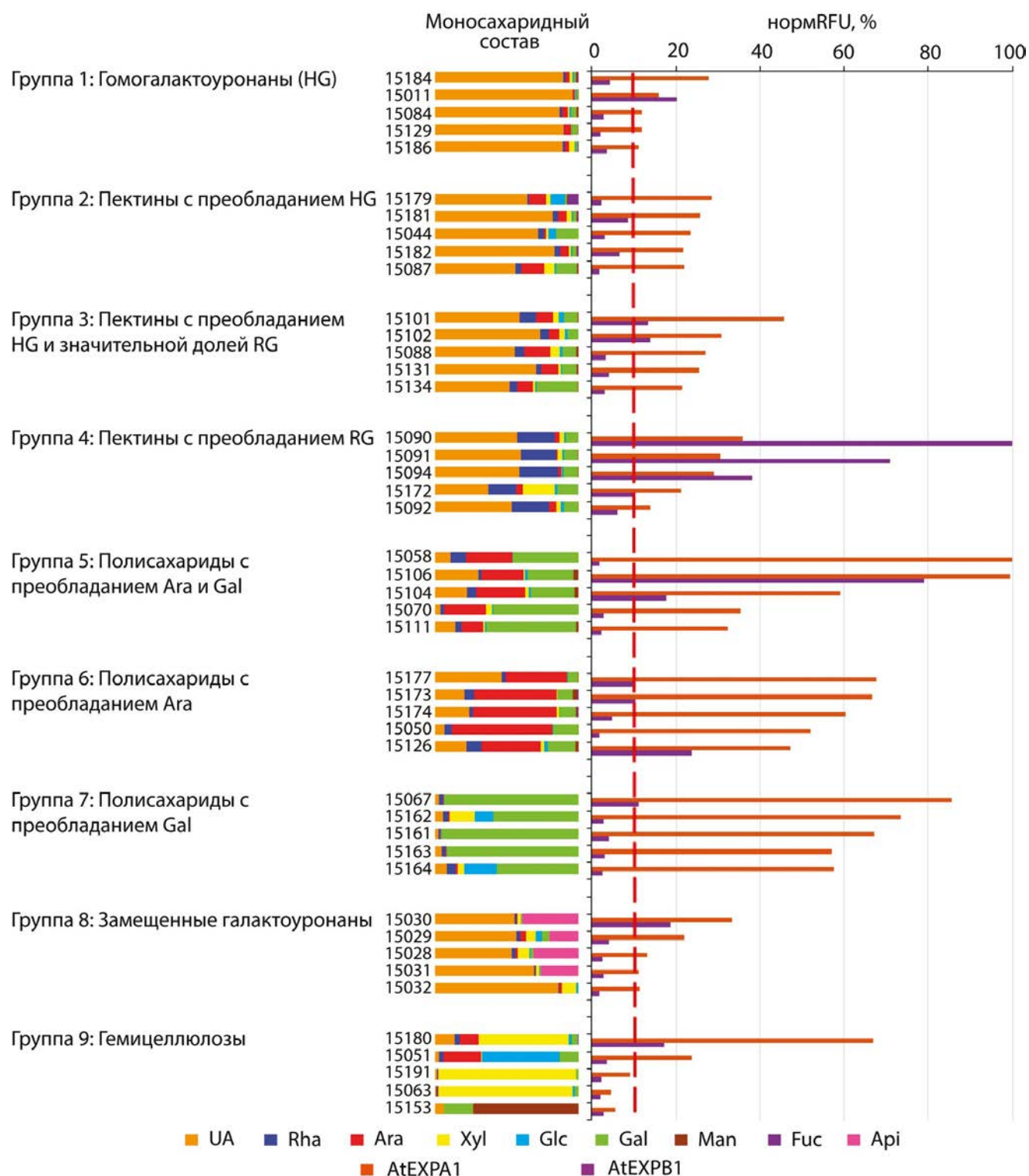


Рис. 5. Взаимодействия рекомбинантных альфа- и бета-экспансинов (AtEXPA1 и AtEXPB1) с полисахаридами растительной клеточной стенки, входящими в состав гликоэрея. Представлено по пять полисахаридов с максимальным уровнем взаимодействия для каждой из 9 групп полисахаридов, существенно различающихся по моносахаридному составу. Для сопоставления результатов отдельных экспериментов с AtEXPA1 и AtEXPB1 данные представлены в % от максимального значения RFU в каждом эксперименте (% норм RFU). Пороговой величиной для отсечки полисахаридов, не продемонстрировавших взаимодействия, считали 10% от максимального значения RFU (указано вертикальной пунктирной линией).

и 15090 (пектин березы пушистой), принадлежащие к разным группам и продемонстрировавшие разную интенсивность взаимодействия с экспансинами на чипе. Также был взят ксиллоглюкан из тамаринда (образец 15148, группа 9), т.к. считается, что основными мишенями альфа-экспансинов могут быть участки тесного взаимодействия ксиллоглюкана и микрофибрилл целлюлозы [1]. По результатам гликоэрея этот полисахарид значимого связывания не продемонстрировал и не вошел в топ-5 своей группы (рис. 5). В качестве отрицательного контроля был взят фруктан из цикория (15165) – растительный полисахарид, не локализующийся в клеточной стенке.

Для AtEXPA1 слабое ингибиторное действие в отношении связывания с образцом 15106 оказывал арабиногалактан 15058 из акации, а остальные в используемом диапазоне концентраций не ингибировали взаимодействие этого экспансина с образцом 15106. Для AtEXPB1 ингибирующее действие оказывал пектин с преобладанием рамногалактуронана I из березы (15090, $IC_{50} = 3$ мкг/мл), а ксиллоглюкан из тамаринда (15148) оказывал лишь слабое ингибирующее действие. Фруктан из цикория (15165) ожидаемо не оказывал действия ни на альфа-экспансин, ни на бета-экспансин. В целом, данные ингибиторного анализа подтверждают результаты, полученные с использованием гликоэрея, включая демонстрацию взаимодействия и особенностей связывания, использованных альфа- и бета-экспансинов с ранее широко не обсуждаемыми вариантами полисахаридов растительной клеточной стенки (рамногалактуронаны I и арабиногалактаны). Интересным отличием бета-экспансина служит значитель-

но более узкий спектр связываемых гликанов по сравнению с таковым у альфа-экспансина. Это может свидетельствовать о большей специфичности этого белка.

ОБСУЖДЕНИЕ

Экспансины способны связываться с различными полисахаридами матрикса. Механизм действия экспансинов на растяжимость клеточной стенки связывают с модификацией сети из микрофибрилл целлюлозы [1]. Эти белки за секунды способны увеличивать растяжимость даже фильтровальной бумаги, которая представляет собой почти чистую целлюлозу, однако их действие усиливается в присутствии некоторых полисахаридов матрикса [5, 12]. Поскольку ключевыми элементами, необходимыми для роста растяжением, обычно считаются ксиллоглюкан и, в случае злаков, глюкуроноарабиноксилан, именно эти полисахариды, в основном, тестировались на взаимодействие с экспансинами. Большинство подобных исследований проводилось с использованием ограниченного набора экспансинов и полисахаридов. Например, связывание бета-экспансина кукурузы ZmEXPB1 с несколькими коммерческими гемицеллюлозами оценивалось по уменьшению количества белка в супернатанте после выдерживания в растворе экспансина нитроцеллюлозной мембраны с нанесенным полисахаридом [34]. Так было продемонстрировано преимущественное связывание ZmEXPB1 с ксиланами, практическое отсутствие взаимодействия для глюкана со смешанным типом связей и глюкоманнана и промежуточные значения для ксиллоглюкана; другие полисахариды при этом не тестировались [34].

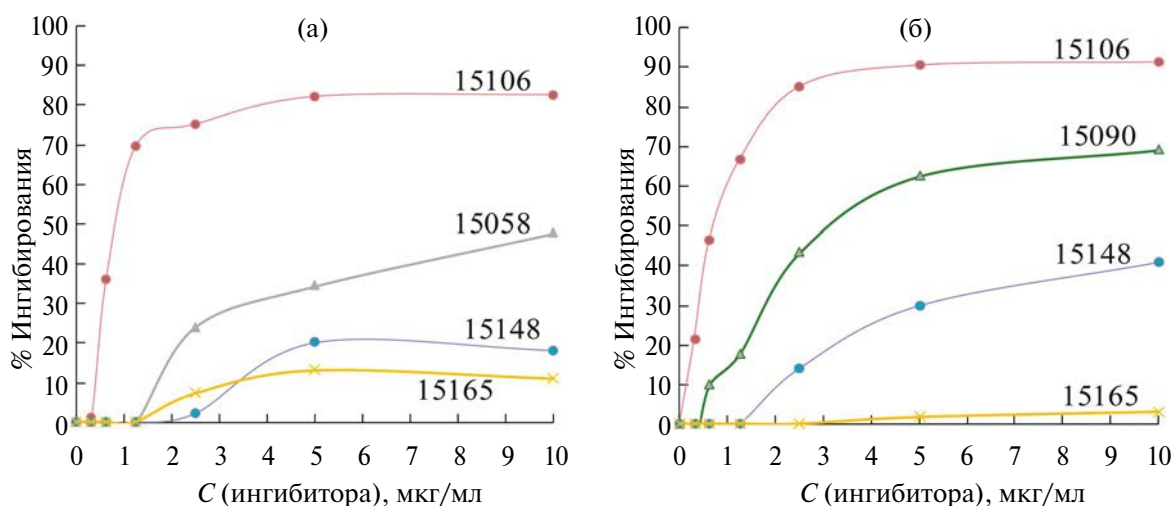


Рис. 6. Ингибирование взаимодействия экспансинов AtEXPA1 (а) и AtEXPB1 (б) с полисахаридом 15106 (арабиногалактан из зелени пихты, концентрация 1 мкг/мл) с помощью различных полисахаридов (15106, 15058, 15148, 15090, 15165, описание в тексте) по результатам планшетного твердофазного анализа. Концентрация экспансинов: 10 мкг/мл.

Выводы о том, что действие альфа-экспансинов опосредовано ксилоглюканом, сделаны также на основании увеличения растяжимости различных образцов на основе целлюлозы при наличии в них ксилоглюкана и значительно меньшего эффекта, или его отсутствия для других гемицеллюлоз [12]. Дополнительным аргументом служит то, что мутант резуховидки Таля *xxt1/xxt2*, не имеющий детектируемого ксилоглюкана, характеризуется меньшими размерами растений по сравнению с диким типом. Предполагается, что это может быть связано с меньшей чувствительностью клеточных стенок этого мутанта к действию альфа-экспансинов [37].

Нами с использованием гликоэстреев осуществлен анализ связывания широкого набора полисахаридов клеточной стенки с двумя экспансинами. Гликоэстрей — ключевой элемент омиксной технологии, позволяющей оценивать взаимодействие гликанов с различными лигандами [18, 38, 39]. Этот инструментальный, сформированный для изучения углеводов-связывающих белков, содержит, как правило, олигомеры, присутствующие в гликозилированных белках, и чаще всего нацелен на изучение специфичности лектинов и антител [39, 40]. Однако даже широкая совокупность олигомеров не может отражать ни разнообразия возможных эпипетов в полисахаридах растительной клеточной стенки, ни, тем более, их пространственной организации в составе полимера. Гликоэстреи, содержащие полисахариды клеточной стенки растений, крайне немногочисленны, хотя отмечается их значительный потенциал в решении многих вопросов [38]. Так, гликоэстреи, содержащие 50 отдельных полисахаридов и более многокомпонентных фракций клеточной стенки, эффективно использовались для характеристики специфичности антител [41]. Для более широкого изучения углеводов-связывающих белков, взаимодействующих с разнообразными гликанами клеточной стенки растений, нами был использован гликоэстрей, содержащий около двух сотен полисахаридов, созданный как описано в работе [18]. Установлено, что экспансины способны связываться с широким набором полисахаридов, в первую очередь — с арабиногалактанами и рамногалактуронанами I (рис. 5). Эти результаты подтверждены и в опытах с планшетным твердофазным анализом (рис. 6). Связывание с кислыми полисахаридами клеточной стенки резуховидки Таля отмечалось и для бактериального экспансина EXLX1 при использовании твердотельного ЯМР; однако считалось, что оно не сказывается на активности экспансинов и не имеет существенной функциональной нагрузки [42].

Взаимодействие экспансинов, которые являются щелочными белками, с полисахари-

дами, содержащими уроновые кислоты, можно попытаться объяснить неспецифическим электростатическим притяжением [9]. Именно так объясняется взаимодействие пектинов с экспансинами, отмеченное в работе, где использовался экспансин-подобный рекомбинантный белок бактериального происхождения BsEXLX1, который напоминает по характеру своего действия альфа-экпансина, хотя и значительно уступает им по активности [43]. Кристаллографические исследования выявили в домене D2 бактериального экспансина поверхность, сформированную слабоконсервативными основными аминокислотами, которая отвечает за связывание экспансина с клеточной стенкой. Более того, именно взаимодействием с глюкуроновой кислотой обусловлено связывание глюкуроноарабиноксилана с бета-экспансином кукурузы EXPB1 (*Zm00001d047147*). Это убедительно продемонстрировано в исследовании, использовавшем ситуацию с исключительно большим накоплением этого бета-экспансина в пыле кукурузы, где взаимодействие оценивалось *in situ* с применением особого варианта твердотельного ЯМР [13].

Действительно, и арабиногалактаны, и рамногалактуронаны I, продемонстрировавшие связывание с экспансинами в наших экспериментах, содержат уроновые кислоты (рис. 5). Однако выявленные с помощью гликоэстрея взаимодействия вряд ли объясняются только наличием заряда: во-первых, не все пектиновые полисахариды взаимодействовали с экспансинами; связывание также не отмечено ни с одним из низкомолекулярных углеводов гликоэстрея, несмотря на наличие в некоторых уроновых кислот (Дополнительные материалы, табл. S1). Во-вторых, “плотность” заряда не была пропорциональна интенсивности связывания, поскольку наибольшая величина взаимодействия характерна для арабиногалактанов и рамногалактуронанов I, в которых доля уроновых кислот многократно ниже, чем в гомогалактуронанах (рис. 5); последние, если и проявляли взаимодействие, то значительно более слабое, в том числе — при отсутствии этерификации карбоксилатов (то есть “экранирования” заряда) метильными группами.

Анализируя состав представленных на гликоэстрее полисахаридов (Дополнительные материалы, табл. S1), не удается выделить моно- или олигосахаридные элементы, которые присутствовали в гликанах, показавших взаимодействие с экспансинами, но отсутствовали в тех, которые не продемонстрировали связывания. В дальнейшем необходимы дополнительные исследования по определению характера взаимодействия и конкретных эпипетов, участвующих в связывании, однако очевидно, что два

исследовавшихся экспансина отличаются по набору предпочтительных полисахаридов-мишеней. Сходные предположения высказывались на основе результатов моделирования различных изоформ экспансинов клубники и сосны, и проведения исследований по моделированию их взаимодействия с различными лигандами методом молекулярного докинга [44, 45].

Паттерн экспрессии различных генов экспансинов имеет параллели в характере распределения полисахаридов клеточной стенки по зонам корня. Гены многих альфа- и бета экспансинов имели четко выраженный дифференциальный характер экспрессии в различных зонах корня (рис. 3). Первичный корень представляет собой продуктивную модельную систему для исследования роста растяжением, поскольку в нем на основании расстояния от чехлика может быть выделено несколько зон, содержащих клетки на разных стадиях развития [14]. Омиксные технологии, включая транскриптомику и протеомику, были многократно использованы для анализа различных тканей растений кукурузы, однако в соответствии с задачами конкретных экспериментов, лишь отчасти реализовали преимущества этой модельной системы: зоны корня, которые использовались для анализов, были слишком крупными, или органы использовались целиком, что не позволяло делать выводы о молекулярных событиях, обуславливающих инициацию, реализацию и окончание роста растяжением [46, 47].

В серии наших экспериментов охарактеризовано формирование и функционирование клеточных стенок в различных зонах корня кукурузы [15–17], что дает возможность сопрычь эти данные с характером экспрессии различных генов экспансинов. Кукуруза, как и все злаки, имеет первичные клеточные стенки II типа, в которых преобладающими полисахаридами матрикса служат глюкуроноарабиноксилан и глюкан со смешанным типом связей [19, 48]. На ранних этапах развития клеток корня кукурузы выражено присутствие ксилоглюкана и пектиновых веществ — характерных компонентов клеточных стенок I типа [15–17]. Экспрессия генов ферментов биосинтеза некоторых пектиновых веществ имеет пик в зоне инициации растяжения клеток, а в ходе активного растяжения наиболее представленными становятся глюкуроноарабиноксилан и глюкан со смешанным типом связей [15]. Наборы генов экспансинов, активно транскрибируемых в меристематической зоне, при индукции роста растяжением и при его наибольших скоростях, существенно различаются (рис. 3). Например, среди представителей клады IX альфа-экспансинов кукурузы, некоторые характеризуются максимальным уровнем транскриптов в чехлике, некоторые — в

меристеме, а некоторые — в зоне раннего растяжения (рис. 3). Эта клада включает гены кукурузы, гомологичные *AtEXPA1* — наиболее полно охарактеризованного альфа-экспансина двудольных растений, а также гомологи *AtEXPA10*, *14* и *15*, для которых недавно была показана стадия- и тканеспецифичная экспрессия в растущем корне резуховидки Таля [49] (рис. 2). Экспрессия этих генов на ранних этапах развития клеток корня кукурузы (рис. 3) соотносится с широкой представленностью в этих зонах компонентов клеточных стенок, типичных для двудольных растений, что подтверждает возможное сходство механизмов растяжения клеточных стенок I и II типов за счет сходства их составов. Однако помимо экспрессии представителей IX клады альфа-экспансинов, в корне кукурузы также были отмечены высокие уровни транскриптов генов, принадлежащих к другим кладам альфа- и бета-экспансинов (рис. 3), что указывает на существование не только сходств, но и различий в механизмах растяжения клеточных стенок I и II типов.

Сопрягая все эти результаты с различиями в связывании рекомбинантных экспансинов с полисахаридами, представленными на гликоэре, мы предполагаем, что дифференциальная экспрессия экспансинов в различных зонах корня имеет не только тканевую и временную привязку, но и объясняется особенностями связывания *in vivo* индивидуальных экспансинов и конкретных полисахаридов матрикса клеточной стенки. Эта гипотеза помогает объяснить наличие большого разнообразия экспансинов и подчеркивает важность взаимодействия этих белков с более широким кругом полисахаридов клеточных стенок, чем это активно обсуждалось ранее.

Большое количество изоформ экспансинов, кодируемое в геномах злаков, по сравнению с геномами двудольных растений может быть обусловлено большим разнообразием полисахаридов матрикса клеточных стенок, характерным для растений с клеточными стенками II типа. При этом считается, что альфа-экспансины не увеличивают растяжимость клеточных стенок злаков, однако они не только кодируются в их геномах, но и активно экспрессируются в различных органах и тканях (рис. 3) [8, 10]. Это может быть связано с тем, что на ранних этапах своего развития клетки злаков имеют клеточные стенки значительно более похожие на клеточные стенки двудольных растений, и приобретают характерный для клеточных стенок II типа состав только на стадии активного роста растяжением [15]. Таким образом, можно предположить, что ткани злаков, использовавшиеся для оценки активности альфа-экспансинов (преимущественно coleoptили), не отвечали на них в первую очередь

потому, что уже не были чувствительны к ним вследствие отсутствия достаточного количества молодых клеток. Роль отдельных изоформ экспансинов в морфогенезе злаков, а также конкретика механизмов действия экспансинов на свойства растительных клеточных стенок требуют дальнейших исследований.

Работа выполнена при поддержке грантов для междисциплинарных проектов Российского научного фонда (№ 20-64-47036, очистка, разделение и характеристика полисахаридов, № 20-63-47110 печать и работа с гликоэреями), а также при поддержке государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН (характеристика филогении и экспрессии экспансинов).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Cosgrove D.J.* Building an extensible cell wall // *Plant Physiol.* 2022. V. 189. P. 1246.
<https://doi.org/10.1093/plphys/kiac184>
2. *Pien S., Wyrzykowska J., McQueen-Mason S., Smart C., Fleming A.* Local expression of expansin induces the entire process of leaf development and modifies leaf shape // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001. V. 98. P. 11812.
<https://doi.org/10.1073/pnas.191380498>
3. *Cho H.T., Cosgrove D.J.* Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2002. V. 14. P. 3237.
<https://doi.org/10.1105/tpc.006437>
4. *Samalova M., Gahurova E., Hejatk J.* Expansin-mediated developmental and adaptive responses: A matter of cell wall biomechanics? // *Quant. Plant Biol.* 2022. V. 3. P. e11.
<https://doi.org/10.1017/qpb.2022.6>
5. *McQueen-Mason S., Cosgrove D.J.* Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994. V. 91. P. 6574.
<https://doi.org/10.1073/pnas.91.14.6574>
6. *Kende H., Bradford K., Brummell D., Cho H.T., Cosgrove D.J., Fleming A., Gehring C., Lee Y., Queen-Mason S., Rose J., Voesenek L.A.* Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins // *Plant Mol. Biol.* 2004. V. 55. P. 311.
<https://doi.org/10.1007/s11103-004-0158-6>
7. *Sampedro J., Cosgrove D.J.* The expansin superfamily // *Genome Biol.* 2005. V. 6. P. 1.
<https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-12-242>
8. *Sampedro J., Guttman M., Li L.C., Cosgrove D.J.* Evolutionary divergence of β -expansin structure and function in grasses parallels emergence of distinctive primary cell wall traits // *Plant J.* 2015. V. 81. P. 108.
<https://doi.org/10.1111/tpj.12715>
9. *Li L.C., Bedinger P.A., Volk C., Jones A.D., Cosgrove D.J.* Purification and characterization of four beta-expansins (Zea m 1 isoforms) from maize pollen // *Plant Physiol.* 2003. V. 132. P. 2073.
<https://doi.org/10.1104/pp.103.020024>
10. *McQueen-Mason S., Durachko D.M., Cosgrove D.J.* Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants // *Plant Cell.* 1992. V. 4. P. 1425.
<https://doi.org/10.1105/tpc.4.11.1425>
11. *Park Y.B., Cosgrove D.J.* A revised architecture of primary cell walls based on biomechanical changes induced by substrate-specific endoglucanases // *Plant Physiol.* 2012. V. 158. P. 1933.
<https://doi.org/10.1104/pp.111.192880>
12. *Whitney S.E., Gidley M.J., McQueen-Mason S.J.* Probing expansin action using cellulose/hemicellulose composites // *Plant J.* 2000. V. 22. P. 327.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00742.x>
13. *Wang T., Chen Y., Tabuchi A., Cosgrove D.J., Hong M.* The target of β -expansin EXPB1 in maize cell walls from binding and solid-state NMR studies // *Plant Physiol.* 2016. V. 172. P. 2107.
<https://doi.org/10.1104/pp.16.01311>
14. *Иванов В.Б.* Клеточные основы роста растений. Москва: Наука, 1974. 222 с.
15. *Kozlova L.V., Nazipova A.R., Gorshkov O.V., Petrova A.A., Gorshkova T.A.* Elongating maize root: zone-specific combinations of polysaccharides from type I and type II primary cell walls // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. P. 10956.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-67782-0>
16. *Petrova A., Gorshkova T., Kozlova L.* Gradients of cell wall nano-mechanical properties along and across elongating primary roots of maize // *J. Exp. Bot.* 2021. V. 72. P. 1764.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eraa561>
17. *Nazipova A., Gorshkov O., Eneyskaya E., Petrova N., Kulminskaya A., Gorshkova T., Kozlova L.* Forgotten actors: Glycoside hydrolases during elongation growth of maize primary root // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 12. P. 802424.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.802424>
18. *Nikiforova A.V., Golovchenko V.V., Mikshina P.V., Patova O.A., Gorshkova T.A., Bovin N.V., Shilova N.V.* Plant polysaccharide array for studying carbohydrate-binding proteins // *Biochemistry (Moscow).* 2022. V. 87. P. 890.
<https://doi.org/10.1134/S0006297922090036>
19. *Kozlova L.V., Ageeva M.V., Ibragimova N.N., Gorshkova T.A.* Arrangement of mixed-linkage glucan and glucuronarabinoxylan in the cell walls of growing maize roots // *Ann. Bot. (Oxford, U. K.).* 2014. V. 114. P. 1135.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcu125>
20. *Bolser D., Staines D.M., Pritchard E., Kersey P.* Ensembl plants: integrating tools for visualizing, mining, and analyzing plant genomics data // *Plant bioinform-*

- matix: Methods and protocols. 2016. V. 1374. P. 115.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3167-5_6
21. *El-Gebali S., Mistry J., Bateman A., Eddy S.R., Luciani A., Potter S.C., Qureshi M., Richardson L.J., Salazar G.A., Smart A., Sonnhammer E.L.L., Hirsh L., Paladin L., Piovesan D., Tosatto S.C.E.* The Pfam protein families database in 2019 // *Nucleic Acids Res.* 2019. V. 47. P. D427.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky995>
 22. *Cosgrove D.J.* Plant expansins: diversity and interactions with plant cell walls // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2015. V. 25. P. 162.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.014>
 23. *Goodstein D.M., Shu S., Howson R., Neupane R., Hayes R.D., Fazo J., Mitros T., Dirks W., Hellsten U., Putnam N., Rokhsar D.S.* Phytozome: a comparative platform for green plant genomics // *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 40. P. D1178.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr944>
 24. *Madeira F., Park Y.M., Lee J., Buso N., Gur T., Madhusoodanan N., Basutkar P., Tivey A.R.N., Potter S.C., Finn R.D., Lopez R.* The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019 // *Nucleic Acids Res.* 2019. V. 47. P. W636.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>
 25. *Nguyen L.T., Schmidt H.A., Von Haeseler A., Minh B.Q.* IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* 2015. V. 32. P. 268.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
 26. *Kalyanamoorthy S., Min B.Q., Wong T.K., Von Haeseler A., Jermini L.S.* ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates // *Nat. Methods.* 2017. V. 14. P. 587.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
 27. *Minh B.Q., Nguyen M.A.T., Von Haeseler A.* Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap // *Mol. Biol. Evol.* 2013. V. 30. P. 1188.
<https://doi.org/10.1093/molbev/mst024>
 28. *Letunic I., Bork P.* Interactive tree of life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation // *Nucleic Acids Res.* 2021. V. 49. P. W293.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
 29. *Kim D., Landmead B., Salzberg S.L.* HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements // *Nat. Methods.* 2015. V. 12. P. 357.
<https://doi.org/10.1038/Nmeth.3317>
 30. *Pertea M., Kim D., Pertea G.M., Leek J.T., Salzberg S.L.* Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown // *Nat. Protoc.* 2016. V. 11. P. 1650.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2016.095>
 31. *Love M.I., Huber W., Anders S.* Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 // *Genome Biol.* 2014. V. 15. P. 550.
<https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
 32. *Su Z.Q., Labaj P.P., Li S., Thierry-Mieg J., Thierry-Mieg D., Shi W., Wang C., Schroth G.P., Setterquist R.A., Thompson J.F., Jones W.D., Xiao W., Xu W., Jensen R.V., Kelly R. et al.* A comprehensive assessment of RNA-seq accuracy, reproducibility and information content by the sequencing quality control consortium // *Nat. Biotech.* 2014. V. 32. P. 903.
<https://doi.org/10.1038/nbt.2957>
 33. *Choi D., Cho H.T., Lee Y.* Expansins: expanding importance in plant growth and development // *Physiol. Plant.* 2006. V. 126. P. 511.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00612.x>
 34. *Yennawar N.H., Li L.C., Dudzinski D.M., Tabuchi A., Cosgrove D.J.* Crystal structure and activities of EXPB1 (Zea m 1), a beta-expansin and group-1 pollen allergen from maize // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006. V. 103. P. 14664.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0605979103>
 35. *Nie S.-P., Wang C., Cui S.W., Wang Q., Xie M.-Y., Phillips G.O.* A further amendment to the classical core structure of gum arabic (*Acacia senegal*) // *Food Hydrocolloids.* 2013. V. 31. P. 42.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.09.014>
 36. *Golovchenko V.V., Khlopin V.A., Patova O.A., Feltsinger L.S., Bilan M.I., Dmitrenok A.S., Shashkov A.S.* Pectin from leaves of birch (*Betula pendula* Roth.): Results of NMR experiments and hypothesis of the RG-I structure // *Carbohydr. Polym.* 2022. V. 284. P. 119186.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119186>
 37. *Park Y.B., Cosgrove D.J.* Changes in cell wall biomechanical properties in the xyloglucan-deficient xxt1/xxt2 mutant of *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2012. V. 158. P. 465.
<https://doi.org/10.1104/pp.111.189779>
 38. *Sørensen I., Pedersen H.L., Willats W.G.* An array of possibilities for pectin // *Carbohydr. Res.* 2009. V. 344. P. 1872.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.12.008>
 39. *Ruprecht C., Bartetzko M.P., Senf D., Dallabernadina P., Boos I., Andersen M.C.F., Kotake T., Knox J.P., Hahn M.G., Clausen M.H., Pfrengle F.* A synthetic glycan microarray enables epitope mapping of plant cell wall glycan-directed antibodies // *Plant Physiol.* 2017. V. 175. P. 1094.
<https://doi.org/10.1104/pp.17.00737>
 40. *Blixt O., Head S., Mondala T., Scanlan C., Huflejt M.E., Alvarez R., Bryan M.C., Fazio F., Calarese D., Stevens J., Razi N., Stevens D.J., Skehel J.J., van Die I., Burton D.R.* Printed covalent glycan array for ligand profiling of diverse glycan binding proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004. V. 101. P. 17033.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0407902101>
 41. *Moller I., Marcus S.E., Haeger A., Verhertbruggen Y., Verhoef R., Schols H., Ulvskov P., Mikkelsen J.D., Knox J.P., Willats W.* High-throughput screening of monoclonal antibodies against plant cell wall glycans by hierarchical clustering of their carbohydrate microarray binding profiles // *Glycoconjugate J.* 2008. V. 25. P. 37.
<https://doi.org/10.1007/s10719-007-9059-7>
 42. *Wang T., Park Y.B., Caporini M.A., Rosay M., Zhong L., Cosgrove D.J., Hong M.* Sensitivity-en-

- hanced solid-state NMR detection of expansin's target in plant cell walls // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013. V. 110. P. 16444.
<https://doi.org/10.1073/pnas.131629011>
43. *Georgelis N., Tabuchi A., Nikolaidis N., Cosgrove D.J.* Structure-function analysis of the bacterial expansin EXLX1 // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 16814.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.225037>
 44. *Mateluna P., Valenzuela-Riffo F., Morales-Quintana L., Herrera R., Ramos P.* Transcriptional and computational study of expansins differentially expressed in the response to inclination in radiata pine // *Plant Physiol. Biochem.* 2017. V. 115. P. 12.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.03.005>
 45. *Valenzuela-Riffo F., Gaete-Eastman C., Stappung Y., Lizana R., Herrera R., Moya-Leon M. A., Morales-Quintana L.* Comparative in silico study of the differences in the structure and ligand interaction properties of three alpha-expansin proteins from *Fragaria chiloensis* fruit // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2020. V. 37. P. 3245.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1517610>
 46. *Marcon C., Malik W.A., Walley J.W., Shen Z., Paschold A., Smith L.G., Piepho H.P., Briggs S.P., Hochholdinger F.* A high-resolution tissue-specific proteome and phosphoproteome atlas of maize primary roots reveals functional gradients along the root axes // *Plant Physiol.* 2015. V. 168. P. 233.
<https://doi.org/10.1104/pp.15.00138>
 47. *Stelplflug S.C., Sekhon R.S., Vaillancourt B., Hirsch C.N., Buell C.R., de Leon N., Kaeppler S.M.* An expanded maize gene expression atlas based on RNA sequencing and its use to explore root development // *Plant Gen.* 2016. V. 9. P. plantgenome2015.04.0025.
<https://doi.org/10.3835/plantgenome2015.04.0025>
 48. *Carpita N.C.* Structure and biogenesis of the cell walls of grasses // *Annu. Rev. Plant Biol.* 1996. V. 47. P. 445.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.445>
 49. *Samalova M., Melnikava A., Elsayad K., Peaucelle A., Gahurova E., Gumulec J., Spyroglou I., Zemlyanskaya E.V., Ubogoeva E.V., Balkova D., Demko M., Blavet N., Alexiou P., Benes V., Mouille G. et al.* Hormone-regulated expansins: expression, localization, and cell wall biomechanics in Arabidopsis root growth // *Plant Physiol.* 2023. V. 19. P. kiad228.
<https://doi.org/10.1093/plphys/kiad228>

УДК 581.1;577.19

ХАРАКТЕРИСТИКА СТРЕССОУСТОЙЧИВОЙ ТРАНСГЕННОЙ ЛИНИИ ПШЕНИЦЫ, СВЕРХЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ ГЕН ФЕРМЕНТА БИОСИНТЕЗА ЖАСМОНАТОВ, 12-ОКСОФИТОДИЕНОАТРЕДУКТАЗЫ *AtOPR3*

© 2024 г. Д. Н. Мирошниченко^{a, b}, А. В. Пиголев^a, К. Г. Тихонов^a, Е. А. Дегтярёв^a,
Е. Ф. Лещенко^{a, c}, В. В. Алексеева^b, А. С. Пушкин^b, С. В. Долгов^b, А. Баснет^d, Д. П. Горбач^d,
Т. С. Леонова^d, А. А. Фролов^{d, e}, Т. В. Савченко^{a, *}

^aПуцинский научный центр биологических исследований,
Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук,
г. Пушкино, Россия

^bФилиал Института биоорганической химии Российской академии наук
им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, г. Пушкино, Россия

^cПуцинский филиал Российского биотехнологического университета, г. Пушкино, Россия

^dДепартамент химии природных соединений,
Институт биохимии растений им. Лейбница,
г. Галле/Заале, Германия

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

*e-mail: savchenko_t@rambler.ru

Поступила в редакцию 27.10.2023 г.

После доработки 21.11.2023 г.

Принята к публикации 27.11.2023 г.

Жасмонаты участвуют в регуляции защитных механизмов в растениях при неблагоприятных условиях среды, а также их роста и развития. В основном, знания о путях биосинтеза и передачи сигналов жасмонатов получены благодаря исследованию модельного двудольного растения *Arabidopsis thaliana*, однако их функции и молекулярные механизмы действия у однодольных растений, а именно у пшеницы, до сих пор остаются малоизученными. В данной работе мы исследовали устойчивость к стрессовым воздействиям мягкой пшеницы сорта Саратовская-60 и созданной на ее основе трансгенной линии (Тг-3) со сверхэкспрессией гена биосинтеза жасмонатов, 12-оксофитодиеноатредуктазы *AtOPR3* (12-OXOPHYTODIENOATE REDUCTASE 3) из *Arabidopsis thaliana*. Несмотря на высокий уровень экспрессии перенесенного гена *AtOPR3*, содержание жасмоновой кислоты и ее конъюгата с изолейцином оказалось неизменным в листьях интактных трансгенных растений. После механического повреждения листьев, содержание жасмоновой кислоты в изучаемой трансгенной линии Тг-3 оказалось даже ниже в сравнении с поврежденными нетрансгенными растениями пшеницы Саратовская-60. Различий в содержании 12-оксофитодиеновой кислоты и жасмоноил-изолейцина не было. При этом стресс-индуцированный уровень экспрессии собственных генов алленоксидсинтазы, регулируемых жасмонатами, в трансгенных растениях Тг-3 стал выше, в сравнении с нетрансгенным контролем. Трансгенные растения пшеницы проявили повышенную устойчивость к заражению некротрофным грибом *Botrytis cinerea*, а также к осмотическому стрессу, вызванному полиэтиленгликолем при прорастании семян. В листьях трансгенной линии Тг-3, зараженных *B. cinerea*, наблюдалась более высокая активность каталазы, фермента антиоксидантной системы, в сравнении с зараженными листьями нетрансгенных растений, что свидетельствует о ее возможной роли в повышении устойчивости Тг-3 к фитопатогену. Таким образом, немногочисленные данные об особенностях функционирования жасмонатной системы в пшенице дополнены новыми данными о роли экспрессии одного из ключевых генов биосинтеза жасмонатов, а именно 12-OXOPHYTODIENOATE REDUCTASE, в регуляции защитных ответов при пониженном стресс-индуцированном уровне жасмоновой кислоты.

Ключевые слова: *Botrytis cinerea*, *Triticum aestivum*, жасмонаты, осмотический стресс, трансгенная пшеница, 12-оксофитодиеноат-редуктаза, устойчивость.

DOI: 10.31857/S0015330324020051, EDN: OBMHDY

ВВЕДЕНИЕ

Растительные гормоны жасмонаты регулируют защитные ответы растений в неблагоприятных условиях окружающей среды, а также некоторые аспекты их роста и развития [1, 2]. В настоящее время путь биосинтеза этих гормонов хорошо исследован, известны основные, хотя и не все, сигнальные пути и механизмы, посредством которых реализуются их регуляторные функции [3].

Регулируемые жасмонатами защитные механизмы являются индуцибельными. В отличие от конститутивных защитных механизмов они подавлены (или не активированы) в благоприятных условиях среды и активируются лишь при необходимости. В связи с этим содержание гормонов в тканях и активность системы передачи их сигналов строго контролируются, в том числе путем регуляции активности ферментов пути биосинтеза жасмонатов и катаболизма/превращений биологически активных форм жасмонатов в неактивные [4, 5]. Уровень этих гормонов и активность сигнальных путей регулируются в зависимости от стадии развития растений, типа ткани, условий окружающей среды. Базовый уровень жасмонатов в интактных листьях растений, растущих в благоприятных условиях, очень низок. В этом состоянии основные репрессоры жасмонатных ответов, транскрипционные факторы (ТФ) JASMONATE ZIM DOMAIN (JAZ), взаимодействуя с группой ко-репрессорных белков, подавляют работу других ТФ, таких как MYC2 или R2R3-MYB (MYB21, MYB24 и др.), которые являются положительными регуляторами жасмонат-индуцируемых генов [6, 7]. Другими важными репрессорами сигналинга жасмоновой кислоты являются ТФ bHLH подгруппы III_d, к которым относятся bHLH17/JASMONATE ASSOCIATED MYC2-like (JAM1), bHLH13/JAM2, bHLH3/JAM3 и bHLH14 [8]. Эти ТФ взаимодействуют с белками JAZ и препятствуют работе транскрипционных активаторов жасмонатных ответов, таких как ТФ MYC2 или транскрипционный комплекс WD-repeat/bHLH/MYB, отвечающих за устойчивость к насекомым и некротрофным патогенам, биосинтез антоцианов, ингибирование роста корня, формирование трихом и репродуктивных органов и деградация хлорофилла [9–11]. Известен и другой репрессор, например, WRKY57, который, взаимодействуя с белками JAZ4/JAZ8 и IAA29

(Indole-3-Acetic Acid inducible 29), подавляет жасмонат-индуцируемое старение листьев [12]. Большой интерес представляет репрессор JAV1 (JASMONATE-ASSOCIATED VQ MOTIF), который подавляет устойчивость растений к патогенам и насекомым, но не затрагивает функции жасмонатов, связанные с регуляцией роста [13, 14].

В условиях стресса, в первую очередь механического повреждения тканей, накопление жасмонатов, так называемый “жасмонатный взрыв”, происходит очень быстро, отчасти благодаря положительной регуляции экспрессии генов биосинтетического пути самими продуктами биосинтеза [15]. Есть и другие факторы, которые вносят вклад в быстрое накопление жасмонатов в неблагоприятных условиях. Так, например, этилен положительно регулирует накопление жасмонатов в условиях стресса с помощью ТФ ERF15 (Ethylene Response Factor15) и ERF16, которые выступают транскрипционными активаторами генов липоксигеназ, алленоксидсинтазы (AOS) и оксофитодиеноатредуктазы (OPR3), ключевых генов биосинтеза жасмонатов [16]. Образовавшиеся в условиях стресса жасмонаты активируют путь передачи сигнала, связываясь с рецептором COI1 (Coronatine-Insensitive 1), и вызывая деградацию белков JAZ, что приводит к высвобождению других ТФ – положительных регуляторов жасмонатных ответов [15].

Важно, чтобы содержание этих стрессовых гормонов быстро возвращалось к базовому уровню после того, как стресс миновал, так как повышенное содержание жасмонатов отрицательно сказывается на росте и развитии растений. Одним из основных регуляторов – терминаторов жасмонат-зависимой транскрипционной активности выступает bHLH ТФ MYC2, то есть тот самый транскрипционный активатор жасмонат-зависимых ответов [17]. Свои функции по регулированию терминации жасмонатного сигналинга MYC2 осуществляет посредством активации других жасмонат-индуцируемых bHLH белков, названных MYC2-TARGETED BHLH (MTB), которые оказывают антагонистический эффект на функционирование регуляторного комплекса MYC2-MED25 (Mediator subunit 25), таким образом образуя авторегуляторную цепь отрицательной обратной связи для прекращения сигналинга жасмонатов.

Дополнительная регуляция обеспечивается тем, что активность генов биосинтеза жасмонатов регулируется не только на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях, но и на эпигенетическом [18, 19], также есть сообщения о возможности альтернативного сплайсинга РНК генов биосинтеза жасмонатов [20].

Сокращения: ЖАК – жасмоновая кислота, ОФДК – 12-оксофитодиеновая кислота, Иле-ЖАК – жасмоноил-изолейцин, OPR – 12-оксофитодиеноатредуктаза, AOS – алленоксидсинтаза, ДМАБ – 3-(диметиламино)бензойная кислота, НСТ – нитросиний тетразолий, СОД – супероксиддисмутаза, ТФ – транскрипционный фактор, МДА – малоновый диальдегид, ПЭГ – полиэтиленгликоль.

Еще один регуляторный уровень формируется путем изменения функциональной активности белков, ферментов биосинтеза жасмонатов и компонентов передачи сигнала. Например, димеризация белков OPR приводит к ингибированию ферментативной активности, как это было показано ранее для белков OPR3 томата [21], а рецепторный белок COI1 фосфорилируется при термоморфогенезе — морфологической перестройке растений в условиях повышенных температур, что сказывается на его функциях [22].

Наличие такой сложной системы активаторов и супрессоров, положительных и отрицательных обратных связей помогает растению, с одной стороны, осуществлять тонкую регуляцию множества физиологических процессов, быстро реагировать на изменения окружающей среды, а с другой стороны, избегать избыточной активации защитных ответов, обычно отрицательно сказывающихся на росте и развитии.

Почти все фундаментальные знания о функционировании жасмонатной системы получены благодаря исследованию модельного двудольного растения *Arabidopsis thaliana* [3, 6]. Насколько эти знания применимы к другим растениям, в частности, к однодольным видам, еще предстоит выяснить. Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) является непростым объектом исследования, поскольку представляет собой аллополиплоид, содержащий хромосомы трех таксонов. После того как стали доступны данные секвенирования генома и экспрессионного профиля мягкой пшеницы, стало очевидным наличие большого числа гомологичных и негомологичных генов, кодирующих ферменты биосинтетического и сигнального путей жасмонатов. Это свидетельствует о том, что жасмонатная система пшеницы намного сложнее, чем у *A. thaliana*. В современной биологии для полного и точного понимания функций генов, важно модифицировать их активность *in planta*.

Цель данной работы — исследовать устойчивость полученных нами ранее трансгенных растений мягкой пшеницы, сверхэкспрессирующих ген биосинтеза жасмонатов *OPR3 A. thaliana*, к некоторым биотическим и абиотическим стрессам, с целью выявления особенностей функционирования жасмонатной системы в пшенице.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. В исследованиях использовали T₃-T₄ растения одновставочной гомозиготной сублинии первичного трансгенного растения пшеницы Tr-3, полученного нами ранее в результате генетической трансформации мягкой пшеницы Саратовская-60 (Sar-60) вектором pBAR-GFP.UbOPR3 [23]. Растения пшеницы для большей части экспериментов вы-

ращивали в условиях зимней теплицы с фотопериодом 16/8 ч при температуре воздуха 25 ± 2°C днем и 20 ± 2°C ночью, с интенсивностью света до 150 мкмоль × м⁻² × с⁻¹. Выращивали по 5 растений в 3-литровых горшках, наполненных универсальным грунтом, с дополнительной стандартной подкормкой. Растения культивировали до стадии четырех-пяти листьев (25–30 сут после посева), для исследований использовали третий и четвертый листья.

Анализ экспрессии генов. Для анализа экспрессии генов суммарную РНК выделяли из тканей листа согласно методике, описанной в предыдущей работе [24]. Относительную экспрессию генов *AtOPR3* и *TaAOS* анализировали методом ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Cycler (Thermo Fisher Scientific), как описано нами ранее [24]. Уровень экспрессии оценивали относительно референсного гена *TaWIN1* [25]. В работе использовали следующие праймеры: *TaWIN1* прямой — 5'-TTT TCTGTGTTCTACTATGAGATCTTGAA-3', *TaWIN1* обратный — 5'-AAGTGCATAATTAACACAGAGGTAGTGATG-3'; *AtOPR3* прямой — 5'-ACGTGCTTCTCATGCAGTGT-3'; *AtOPR3* обратный — 5'-ACTTCACGTGGGAACCATCG-3'; *TaAOS* прямой — 5'-GGCCGGAGAGAAGTTCCAC-3', *TaAOS* обратный — 5'-CTTCTCCAGCGCCTCTATCG-3'.

Анализ содержания фитогормонов. Для анализа фитогормонов использовали интактные и механически поврежденные листья. Для поранения лист зажимали пинцетом поперек листовой пластины по всей его длине с интервалом 10 см. Ткани листьев собирали через 30 мин после ранения параллельно с необработанным контролем. После сбора материал сразу же измельчали в жидком азоте с помощью ступки и пестика, затем в шаровой мельнице Mixer Mill MM 400 с шарами из нержавеющей стали диаметром 3 мм ("Retsch", Naan, Германия) при частоте вибрации 30 Гц в течение 2 мин. Экстракцию и анализ гормонов проводили, как описано ранее [24].

Анализ устойчивости к *Botrytis cinerea*. Инокулят конидий некротрофного гриба *B. cinerea* готовили в соответствии с описанным ранее протоколом [26]. Патоген выращивали на картофельно-декстрозном агаре при pH 6.5. Конидии собирали через 10 дней после посева путем промывания спорообразующих культур дистиллированной водой. Суспензию конидий фильтровали через стекловату для удаления фрагментов мицелия, их концентрацию определяли с помощью гемоцитометра и разбавляли до концентрации 2 × 10⁶ конидий/мл. Водную суспензию конидий перед нанесением на листья разбавляли в четыре раза смесью 2 : 1 дистиллированной стерильной воды и персико-

вого сока (стерилизованного с использованием мембранного фильтра).

Срезанные фрагменты листьев длиной 9 см заражали суспензией конидий *B. cinerea* объемом 4 мкл. Инфицирование листьев проводили во второй половине дня. Концы листьев накрывали полосками фильтровальной бумаги для предотвращения высыхания. Срезанные листья после заражения оставляли на фильтровальной бумаге, пропитанной раствором кинетина (10 мг/л), при комнатной температуре на рассеянном естественном свете 5 дней. Размер повреждений измеряли по цифровым изображениям листьев с использованием компьютерной программы ImageJ, с обязательным включением в изображения масштабированных объектов [27].

Анализ активности антиоксидантных ферментов. Для анализа образцы листьев отбирали в течение 5 дней, начиная со дня заражения конидиями *B. cinerea*, замораживали при -70°C , растирали в жидком азоте и готовили вытяжки водорастворимых ферментов в буферном растворе, содержащем 60 мМ фосфат Na, 0.1 мМ ЭДТА, pH 7.2 и ингибитор протеаз. Крупную взвесь отделяли процеживанием сквозь синтетическую ткань, мелкую – центрифугированием при 24000 g в течение 20 мин. Вытяжки хранили замороженными при -70°C . Содержание продуктов перекисного окисления липидов, а именно малонового диальдегида (МДА), измеряли в вытяжках на 80% этаноле по реакции с тиобарбитуровой кислотой [28].

Активность ферментов в водных вытяжках измеряли в растворе, содержащем 60 мМ фосфат Na, 0.1 мМ ЭДТА, pH 7.2. Активность каталазы измеряли по скорости выделения O_2 при разложении 2 мМ H_2O_2 с использованием кислородного электрода Кларка (“Hansatech”, Англия). Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Agilent 8453 (“Agilent Technologies”, США) с кюветным отделением, оборудованным магнитной мешалкой. Активность пероксидазы определяли по методу Ngo и Lenhoff [29]. Пероксидазную активность оценивали по скорости образования индаминового красителя при 590 нм ($\epsilon = 47600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) в присутствии 0.05 мМ 3-метил-2-бензотиазолинон-гидразона (гидразон), 0.5 мМ 3-(диметиламино) бензойной кислоты (ДМАБ) и 0.025 мМ H_2O_2 . Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по способности фермента ингибировать восстановление нитросинего тетразолия (НСТ) супероксидным анионом [30]. Среда измерения содержала 0.05 мМ НСТ, 13 мМ L-метионин, 2 мкМ рибофлавин. Для образования супероксидного аниона раствор во время измерения освещали синим светодиодом и измеряли скорость цветной реакции образования формазана из НСТ при 560 нм. За 1 условную единицу актив-

ности СОД принимали ее количество, подавляющее цветную реакцию на 50% [31]. Удельные активности ферментов выражали по скорости измеряемой реакции, пересчитанной на 1 г сырой ткани.

В работе использованы реактивы: НСТ, L-метионин, NaH_2PO_4 , ЭДТА (“AppliChem”, Германия); ДМАБ, гидразон, ионол (“Sigma-Aldrich”, США); ТХУ (“Химмед”, Россия); тиобарбитуровая кислота (“ДиаэМ”, Россия); H_2O_2 (Тульская фармацевтическая фабрика, Россия); рибофлавин (“Reanal”, Венгрия); ингибиторы протеаз (“Roche”, Швейцария).

Тест на устойчивость к осмотическому стрессу. Для анализа семена проращивали в пластиковых чашках Петри диаметром 9 см. Поверхностную стерилизацию семян проводили путем 30-секундного погружения в 80% этиловый спирт с последующей 20-минутной инкубацией в 4% растворе гипохлорита натрия. Затем семена тщательно промывали в стерильной воде и помещали в чашки Петри, выстланные двумя слоями фильтровальной бумаги, по 15–20 семян на чашку. В чашки добавляли по 8 мл стерильной воды или раствора полиэтиленгликоля 6000 (ПЭГ) (“PanReas Applichem”, Италия). При необходимости воду или раствор ПЭГ добавляли в чашки во время длительной инкубации. Чашки инкубировали при $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ с соблюдением 12/12 ч (день/ночь) фотопериода ($10\text{--}35 \text{ мкМ}$ фотонов $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Длину корней проростков, выращенных в воде, измеряли на 5 сут после замачивания семян, проростков выращенных на 20% ПЭГ 6000 – на 8 сут.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку данных проводили в программах LibreOffice Calc, jamovi, Origin (“OriginLab Corporation”, США) и Microsoft Excel (“Microsoft”, США). Статистическую значимость различий для большинства экспериментов определяли с помощью *t*-теста Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $P \leq 0.05$ и отмечали на графиках звездочкой.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ содержания жасмонатов в трансгенных растениях пшеницы Tr-3. Прежде всего, мы убедились в том, что перенесенный ген *AtOPR3* экспрессируется в тканях исследуемых растений. В трансгенной линии Tr-3 данный ген находится под контролем конститутивного промотора *Ubi1* кукурузы [23], что должно обеспечить его высокую экспрессию на всех стадиях развития растений. Поскольку гены биосинтеза жасмонатов могут регулироваться также на пост-транскрипционном уровне, мы изучили экспрессию трансгена как в интактных, так и в поврежденных листьях растений. С помощью метода ОТ-ПЦР в

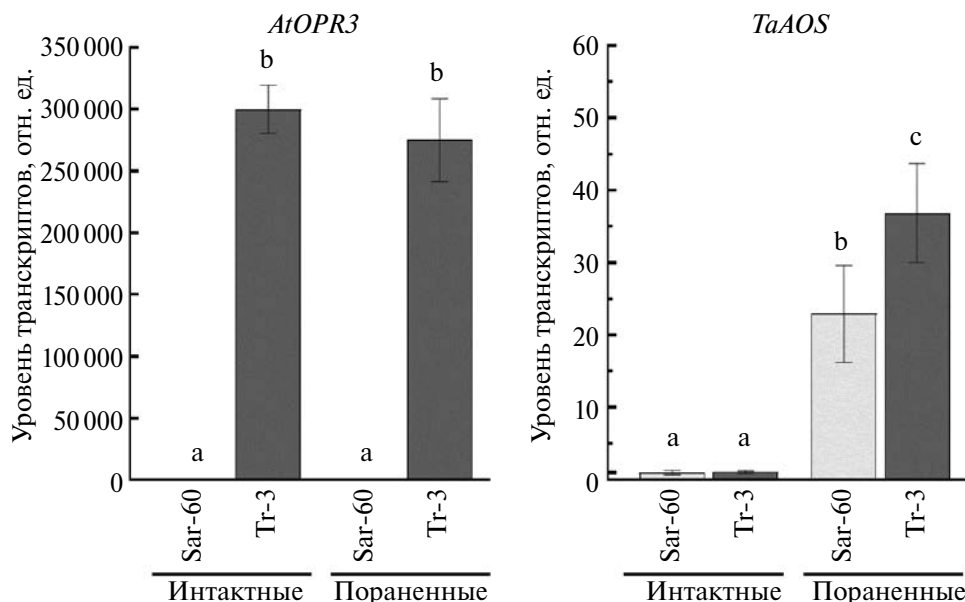


Рис. 1. Анализ экспрессии генов пути биосинтеза жасмонов в трансгенных (Tr-3) и контрольных растениях (Sar-60) пшеницы. Данные представляют собой средние значения $\pm$ стандартные ошибки ($n = 4$). Буквы обозначают статистически значимые различия при $P < 0.05$ (ANOVA с последующим тестом Дункана).

режиме реального времени подтверждено одинаково высокое содержание мРНК трансгена при поранении растений и без него, в то время как нетрансгенные родительские растения не накапливали мРНК *AtOPR3* (рис. 1). Также, мы оценили уровни экспрессии собственного гена алленоксидсинтазы пшеницы (*TaAOS*). Результаты показали, что механическое повреждение приводит к осязательному повышению содержания транскрипта *TaAOS* как в контрольных растениях, так и в трансгенной линии. Более того, стресс-индуцируемый уровень *TaAOS* оказался достоверно выше ($P = 0.0247$) в трансгенной линии со сверхэкспрессией *AtOPR3* (рис. 1).

На рисунке 2 представлены результаты анализа содержания основных жасмонов, 12-оксофитодиеновой кислоты (12-ОФДК), жасмоновой кислоты (ЖАК) и конъюгата жасмоноил-изолейцина (Иле-ЖАК), у трансгенных и нетрансгенных родительских растений в intactных и пораненных листьях. Как было показано нами ранее [24], растения мягкой пшеницы Саратовская-60 проявляют довольно высокую внутригрупповую дисперсию содержания фитогормонов. Вследствие этого, а также из-за низкого исходного уровня гормонов, не удалось выявить статистически значимые различия в содержании жасмонов в листьях нетрансгенных и трансгенных растений мягкой пшеницы (рис. 2а–в). В механически поврежденных растениях уровень ЖАК оказался значимо ниже в трансгенной линии Tr-3 по сравнению с нетрансгенным контролем. Достоверных различий в содержании 12-ОФДК и Иле-ЖАК обнаруже-

но не было, хотя средние значения оставались чуть ниже в трансгенной линии Tr-3.

Исследование устойчивости трансгенной линии пшеницы Tr-3 к *B. cinerea*. Изучили развитие инфекции некротрофного фитопатогенного гриба на третьем листе трансгенной линии гексаплоидной пшеницы Tr-3 (рис. 3). Заражение листьев пшеницы конидиями *B. cinerea* сопровождается образованием желтой (хлоротической) и бурой (некротической) зон [24]. У трансгенной пшеницы суммарная длина повреждений листьев и величина некроза были на 35% меньше, чем у контрольной пшеницы Саратовская-60 ($P < 0.01$), свидетельствуя о повышенной устойчивости линии Tr-3 к заражению *B. cinerea*. При этом листья Tr-3 сохраняли более яркую зеленую окраску.

Для того чтобы выявить механизмы, обуславливающие повышенную устойчивость трансгенных растений к патогену, мы проанализировали состояние антиоксидантной системы в листьях незараженных и зараженных растений в процессе развития симптомов инфекции. Для этого измерили содержание продуктов перекисного окисления липидов (малонового диальдегида) и активность трех антиоксидантных ферментов (пероксидазы, каталазы и СОД). Содержание МДА во всех образцах составляло приблизительно 100 нмоль/г сырого веса независимо от наличия или отсутствия заражения грибом, времени после инокуляции и генотипа (трансген или родительский сорт) (рис. 4а). Пероксидазная активность увеличилась уже через сутки после заражения, а к 3 дню она достигла наибольших значений, превысив исходную в

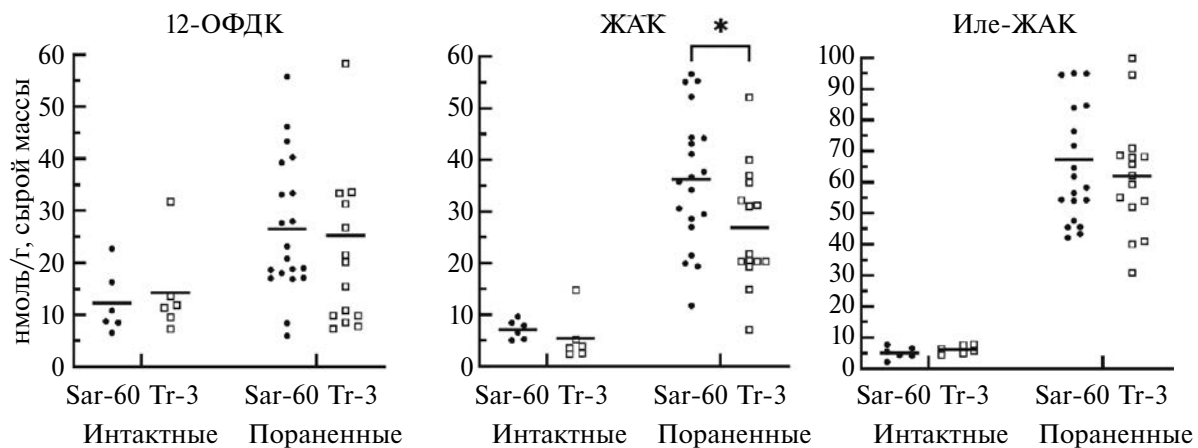


Рис. 2. Содержание индивидуальных жасмонатов (12-ОФДК; ЖАК; Иле-ЖАК) в intactных и пораненных листьях гексаплоидной пшеницы Саратовская-60 (Sar-60) (закрашенные круги) и трансгенного растения, сверхэкспрессирующего *AtOPR3* (Tr-3) (незакрашенные квадраты). Каждый круг и квадрат представляют индивидуальное растение; горизонтальные линии — среднее значение. Звездочка обозначает статистически значимое различие между двумя генотипами при $P < 0.05$.

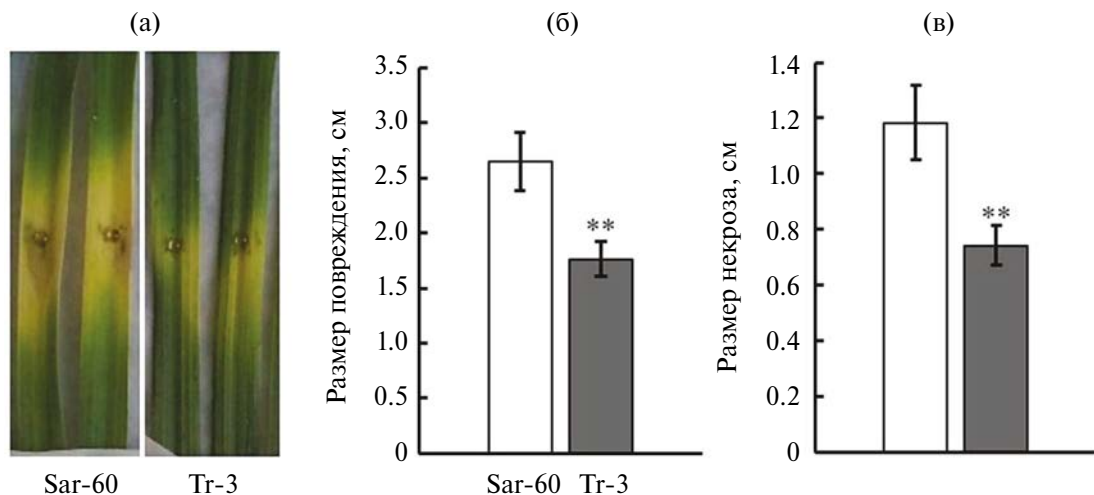


Рис. 3. Восприимчивость трансгенной линии пшеницы Tr-3 к *Botrytis cinerea*. (a) Репрезентативные изображения зараженных листьев на пятые сутки после инфицирования; (б) Размер суммарного повреждения листьев; (в) Размер некротических повреждений листьев. Данные представляют собой средние значения трех независимых экспериментов по 6–7 биологических повторностей со стандартной ошибкой среднего. ** — статистически значимое различие между двумя генотипами при $P < 0.01$, согласно оценке по *t*-тесту Стьюдента.

3 раза (рис. 4б). В незараженном контроле пероксидазная активность также возрастала, но с задержкой на 1–2 сут. Через 4 дня эксперимента пероксидазная активность в зараженных листьях нетрансгенных растений понизилась, тогда как в незараженных листьях и зараженной трансгенной линии Tr-3 она осталась неизменной или увеличилась. Достоверное различие ($P < 0.05$) между зараженными листьями Tr-3 и Sar-60 проявилось на 5 день, однако если учитывать продолжительность всего эксперимента, дисперсионный анализ не подтвердил достоверного влияния генотипа на пероксидазную активность ($P = 0.2$).

Схожую тенденцию наблюдали по отношению к супероксиддисмутазной активности, а именно ее повышение в течение 4 сут с последующим снижением на 5 день. Так, начиная со вторых суток после инокуляции *B. cinerea* (рис. 4г) СОД активность возросла в среднем на 50%; на пятые сутки она снизилась почти до исходного значения. В незараженных листьях также наблюдался значительный рост, но с задержкой на один день, при этом снижения активности на 5 день не происходило. Значимых различий между трансгенными и нетрансгенными растениями не обнаружено.

Каталазная активность уменьшилась, начиная с 4 дня после инокуляции, достигая 50%

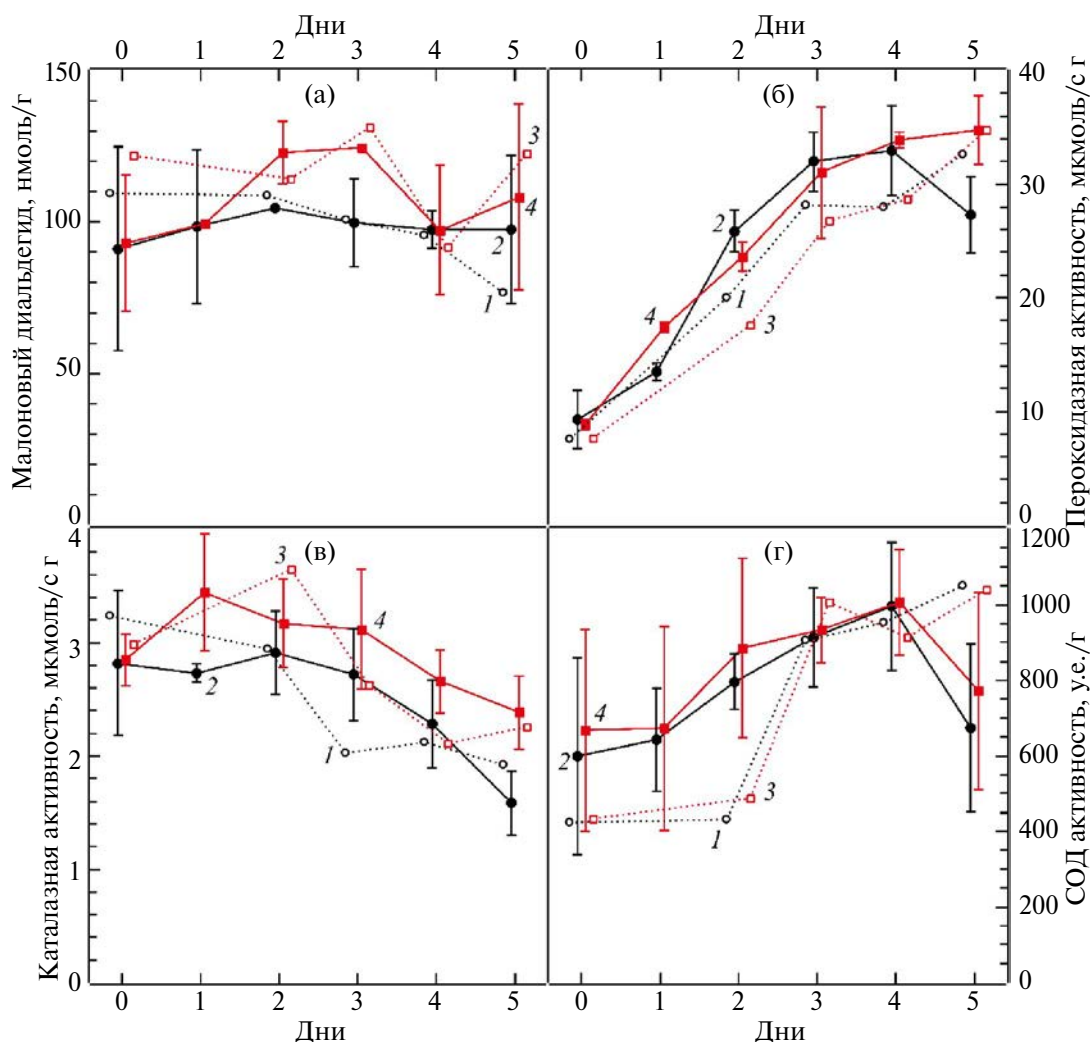


Рис. 4. Зависимость содержания МДА и активности антиоксидантных ферментов в листовой ткани Sag-60 (1, 2) и Tr-3 (3, 4), не зараженной (1, 3) и зараженной *B. cinerea* (2, 4), от времени, прошедшего с начала инокуляции *B. cinerea*: (а) содержание МДА; (б) активность пероксидазы; (в) активность каталазы; (г) активность СОД. Для зараженных листьев представлены средние значения и стандартные отклонения по 2–3 биологическим повторностям.

в листьях пшеницы Саратовская-60 (рис. 4в). В целом, активность снижалась как в зараженных, так и в незараженных листьях. При заражении трансгенной линии Tr-3 каталазная активность была выше по сравнению с контрольным сортом пшеницы в 1.1–1.5 раза. Дисперсионный анализ показал, что различие между трансгенными и контрольными растениями статистически достоверно ($P < 0.01$).

Исследование устойчивости Tr-3 к осмотическому стрессу. В качестве модели абиотического стресса использовали осмотический стресс, создаваемый с помощью 20% ПЭГ 6000. При проращивании семян сначала оценивали их всхожесть, подсчитывая число проростков с корнями более 1 мм. Семена обеих групп легко прорастали как в воде, так и в присутствии 20% ПЭГ; эффективность прорастания составила 100%. На рисунке 5 представлены суммированные данные

длины наиболее развитого корня трансгенных и нетрансгенных образцов. Осмотический стресс приводил к значительному подавлению роста корней обоих генотипов, но в значительно меньшей степени негативный эффект наблюдали у линии экспрессирующей *AtOPR3*. Мы наблюдали существенную разницу между длиной корней Саратовской-60 и трансгенной линии Tr-3 как в условиях стресса, так и без него, но интересно, что при проращивании на воде корни линии Tr-3 были короче, тогда как в условиях осмотического стресса – длиннее.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы описывали создание коллекции трансгенных растений гексаплоидной мягкой пшеницы, сверхэкспрессирующих гены биосинтеза жасмонатов [23, 24]. Для сверхэкспрессии

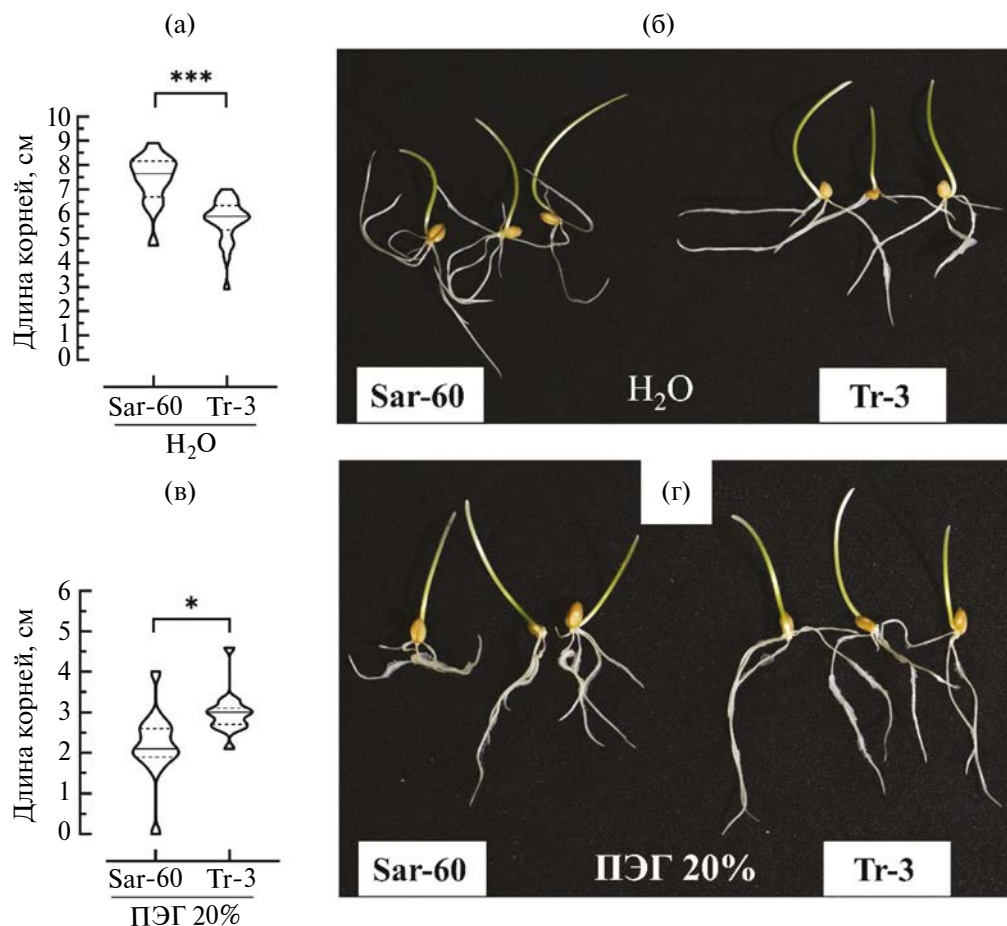


Рис. 5. Рост корней проростков нетрансгенных (Sar-60) и трансгенных растений (Tr-3) на воде (а, б) и 20% растворе ПЭГ 6000 (в, г). (а, в) — репрезентативные изображения проростков на воде (а) и на ПЭГ (в). Графики отображают длину самых развитых корней проростков ($n = 15-25$); сплошные горизонтальные линии показывают медиану, пунктирные линии — 75 и 25 процентиля распределения. Звездочками отмечены статистически значимые различия между генотипами, согласно оценке по t -тесту Стьюдента (* — $P \leq 0.05$), (***) — $P \leq 0.001$).

в пшенице был выбран хорошо изученный ген *A. thaliana AtOPR3*, чья роль в биосинтезе жасмонов была экспериментально подтверждена. Растения независимых трансгенных линий различаются по некоторым фенотипическим признакам, особенно по устойчивости к стрессовым факторам. Для растений линии Tr-3 характерна выраженная задержка в росте и развитии, особенно на ранних этапах развития, также они демонстрируют устойчивость к низким температурам [23], т. е. проявляются признаки, которые характерны для влияния жасмонов, производимых растением эндогенно или нанесенных экзогенно. Растения трансгенной линии Tr-3 характеризовались наиболее высоким уровнем экспрессии перенесенного гена *AtOPR3* и несколько повышенным базовым уровнем ЖАК (анализ был выполнен на стадии четырех листьев растений T₂-T₃, анализировали экстракты третьего листа). В настоящей работе мы продолжили подробное изучение этой трансгенной линии, но в этот раз для большинства анализов

использовали третий лист растений, находящихся на стадии формирования четырех или пяти листьев. Принимая во внимание, что базовый уровень жасмонов в пшенице Саратовская-60 очень низок и разброс в значениях между индивидуальными растениями очень велик, как ранее было показано в наших исследованиях [24], оценку содержания жасмонов и уровня экспрессии гена биосинтеза жасмонов проводили в механически поврежденных листьях, т. е. в условиях индуцируемого стресса. В растениях линии Tr-3 (семенное поколение T₄) по-прежнему высок уровень экспрессии трансгена, причем механическое повреждение не приводит к значимому изменению уровня мРНК (рис. 1), что, скорее всего, свидетельствует об отсутствии посттранскрипционной регуляции экспрессии перенесенного гена. Разница в базовом уровне жасмонов между трансгенными и нетрансгенными растениями не выявлена, а вот результаты анализов содержания гормонов в поврежденных листьях оказались неожиданными: хотя в обо-

их генотипах наблюдалось повышение уровней жасмонатов, уровень ЖК в трансгенной линии Tr-3 оказался ниже, чем в родительском сорте (рис. 2). Также, мы оценили изменение уровня экспрессии собственного гена *TaAOS*, активность которого обычно положительно регулируется жасмонатами, используя для этого праймеры, подобранные к консервативному участку пшеничных гомеологов *AOS*, так как в настоящий момент ткане- и времяспецифичность экспрессии отдельных генов гомеологов *AOS* генома пшеницы мало исследована. Стресс-индуцируемый уровень *TaAOS*, оказался достоверно выше в трансгенной линии со сверхэкспрессией *AtOPR3* (рис. 1). Одно из возможных объяснений таких противоречивых данных – транзистентный характер индукции жасмонатной системы и сложность регуляторной системы, поддерживающей уровень гормона в тканях и активность путей передачи сигнала. Трансгенная линия Tr-3, сверхэкспрессирующая *AtOPR3*, послужит удобным инструментом для изучения этих регуляторных механизмов в будущем.

Недавно мы опубликовали данные, показывающие, что повышенный стресс-индуцируемый уровень жасмонатов в трансгенных растениях гексаплоидной (мягкая пшеница) и тетраплоидной пшеницы (полба) коррелирует с повышенной восприимчивостью к *B. cinerea* [24]. Эта работа хорошо согласуется с представленными здесь данными о повышенной устойчивости листьев пшеницы со сниженным стресс-индуцируемым уровнем ЖАК (рис. 3), однако противоречит многим сообщениям о защитных функциях жасмонатов против *B. cinerea* [32] и других некротрофных фитопатогенов [33]. В то же время, была показана и негативная функция жасмонатов в защите растений от некротрофов. Так, у жасмонат-дефицитного мутанта томата *def1* (*defense 1*) симптомы поражения некротрофным грибом *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* оказались меньше по сравнению с растениями дикого типа, а обработка метилжасмонатом снижала устойчивость к заболеванию как мутантных растений, так и дикого типа [34]. По утверждению авторов, ЖАК не влияет на действие токсина гриба AAL (*Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*), но может негативно регулировать общую резистентность растения-хозяина на более поздней стадии заражения.

Известно, что салициловая кислота часто выступает антагонистом ЖАК, проявляя протекторные свойства при заболеваниях, вызываемых биотрофными патогенами [35], однако есть данные о том, что салициловая кислота положительно влияет на локальную защиту от *B. cinerea*, не изменяя экспрессии *PR1* или *PDF 1.2* (*PLANT DEFENSIN 1.2*) [36]. Помимо антагонизма жасмонатов и салициловой кислоты, у

A. thaliana описано взаимное подавление двух параллельных ветвей жасмонатного сигналинга: ERF- и MYC-ветви. Первая реагирует на поражение фитопатогенами, а вторая – фитофагами. ТФ MYC2 может напрямую связываться с ТФ EIN3 (Ethylene Insensitive 3) и ТФ EIL1 (EIN3-Like1), мешая связыванию EIN3 с промотором гена-мишени, кодирующего ТФ ORA59 (Octadecanoid-Responsive Arabidopsis 59), что способствует заражению *B. cinerea* и другими некротрофами [37, 38].

Негативный эффект жасмонатов также может быть связан с регуляцией старения листьев. У *A. thaliana* MYC2 положительно регулирует жасмонат-опосредованное старение листьев, что может негативно влиять на защиту от некротрофных и биотрофных фитопатогенов [33, 39]. При этом не всегда жасмонат-опосредованное старение связано с жасмонат-зависимыми защитными механизмами. Например, репрессор жасмонатного ответа JAZ7 *A. thaliana* замедляет старение листьев, но способствует заражению некротрофами, при этом защищая от биотрофов. Ряд исследований указывает на связь между устойчивостью к патогенам, старением листьев и активностью антиоксидантных ферментов. Известно, что у *A. thaliana* ряд ключевых генов, регулирующих старение, SAG-гены (*Senescence-Associated Genes*), транскрипционно активируются в ответ на действие пероксида водорода, а жасмонаты способны подавлять экспрессию гена антиоксидантного фермента каталазы, а также, возможно, и других генов антиоксидантных ферментов во время старения листьев MYC2-зависимым образом (возможно, также и MYC3-, MYC4-зависимым), тем самым увеличивая концентрацию пероксида водорода [39]. Кроме этого, CAT2 способствует активности ACS2 (Acyl-CoA Oxidase 2) и ACS3, ферментов β-окисления, заключительной стадии синтеза жасмоновой кислоты, а салициловая кислота ингибирует активность CAT2 [40]. Помимо негативной регуляции старения листьев каталаза и пероксидаза способны разлагать пероксид водорода, который выделяется кончиками гиф и инфекционными подушками гриба *B. cinerea* для окисления полимеров кутикулы растений [41].

В данной работе оценку степени окислительного стресса в листьях проводили с помощью измерения концентрации продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой. Этот метод широко используется, однако при интерпретации полученных результатов важно помнить, что реакция ТБК и МДА не является специфичной, а МДА – основной, но не единственный продукт перекисного окисления липидов. Полученные данные (рис. 4) указывают на отсутствие выраженного окислительного стресса в срезанных листьях пшеницы как в от-

сутствие, так и в присутствии *B. cinerea*. В кинетике изменения активности антиоксидантных ферментов наблюдаются значительные сходства между зараженными и незараженными листьями. Вероятно, основной причиной таких изменений служит старение листа. Развитие гриба, в основном, не приводит к дополнительному увеличению или уменьшению ферментных активностей, а лишь ускоряет эти изменения на 1–2 сут. Достоверные различия между генотипами обнаружены лишь для пероксидазной и каталазной активностей: пероксидазная активность выше в трансгенной линии Tr-3 по сравнению с Саратовской-60 на пятые сутки после заражения, а каталазная – с 1 по 5 дни.

Антиоксидантная система служит неспецифическим приспособлением растений против различных неблагоприятных условий, поэтому можно предположить, что увеличение активности антиоксидантных ферментов является одной из причин повышенной устойчивости трансгенной линии Tr-3 в условиях стресса. Необходимо отметить, что наблюдаемое повышение активности каталазы у линии Tr-3, сверхэкспрессирующей *AtOPR3*, содержащей пониженный стресс-индуцируемый уровень ЖАК, оказалось неожиданным, так как противоречит данным о том, что жасмонаты усиливают активность антиоксидантных ферментов растений, по крайней мере в условиях абиотических стрессов [42], хотя про- и антиоксидантное действие гормонов может зависеть от их концентрации, как это было показано для салициловой кислоты [43]. Молекулярные механизмы, обуславливающие устойчивость проростков трансгенной линии Tr-3 в условиях осмотического стресса (рис. 5), еще предстоит выяснить. В решении этой и других задач будут очень полезны генетически модифицированные растения пшеницы с измененной активностью жасмонатной системы.

Работа поддержана Российским Научным Фондом (грант № 22-16-00047). Исследование антиоксидантной системы поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122041100274-6).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang J., Song L., Gong X., Xu J., Li M. Functions of jasmonic acid in plant regulation and response to abiotic stress // *Inter. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 1446. <https://doi.org/10.3390/ijms21041446>
2. Пиголев А.В., Дегтярёв Е.А., Мирошниченко Д.Н., Савченко Т.В. Перспективы применения жасмонатов, салицилатов и абсцизовой кислоты в сельском хозяйстве для повышения стрессоустойчивости растений // *Сельскохозяйственная биология*. 2023. Т. 58. С. 3. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2023.1.3rus>
3. Wasternack C., Song S. Jasmonates: biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription // *J. Exp. Bot.* 2017. V. 68. P. 1303. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw443>
4. Koo A., Howe G. Catabolism and deactivation of the lipid-derived hormone jasmonoyl-isoleucine // *Front. Plant Sci.* 2012. V. 3. P. 19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00019>
5. Heitz T., Smirnova E., Marquis V., Poirier L. Metabolic control within the jasmonate biochemical pathway // *Plant Cell Physiol.* 2019. V. 60. P. 2621. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz172>
6. Wasternack C., Strnad M. Jasmonate signaling in plant stress responses and development – active and inactive compounds // *New Biotechnol.* 2016. V. 33. P. 604. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.11.001>
7. Song S., Qi T., Huang H., Ren Q., Wu D., Chang C., Peng W., Liu Y., Peng J., Xie D. The jasmonate-ZIM domain proteins interact with the R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect jasmonate-regulated stamen development in *Arabidopsis* // *Plant cell.* 2011. V. 23. P. 1000. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.083089>
8. Goossens J., Mertens J., Goossens A. Role and functioning of bHLH transcription factors in jasmonate signalling // *J. Exp. Bot.* 2016. V. 68. P. 1333. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw440>
9. Nakata M., Mitsuda N., Herde M., Koo A.J., Moreno J.E., Suzuki K., Howe G.A., Ohme-Takagi M. A bHLH-type transcription factor, ABA-INDUCIBLE BHLH-TYPE TRANSCRIPTION FACTOR/JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1, acts as a repressor to negatively regulate jasmonate signaling in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2013. V. 25. P. 1641. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.111112>
10. Sasaki-Sekimoto Y., Jikumaru Y., Obayashi T., Saito H., Masuda S., Kamiya Y., Ohta H., Shirasu K. Basic helix-loop-helix transcription factors JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1), JAM2, and JAM3 are negative regulators of jasmonate responses in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2013. V. 163. P. 291. <https://doi.org/10.1104/pp.113.220129>
11. Fonseca S., Fernandez-Calvo P., Fernandez G.M., Díez-Díaz M., Gimenez-Ibanez S., Lopez-Vidriero I., Godoy M., Fernandez-Barbero G., Van Leene J., De Jaeger G. bHLH003, bHLH013 and bHLH017 are new targets of JAZ repressors negatively regulating JA responses // *PloS One.* 2014. V. 9. P. e86182. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086182>

12. Jiang Y., Liang G., Yang S., Yu D. Arabidopsis WRKY57 functions as a node of convergence for jasmonic acid—and auxin-mediated signaling in jasmonic acid—induced leaf senescence // *Plant Cell*. 2014. V. 26. P. 230.
<https://doi.org/10.1105/tpc.113.117838>
13. Hu P., Zhou W., Cheng Z., Fan M., Wang L., Xie D. JAV1 controls jasmonate-regulated plant defense // *Molec. Cell*. 2013. V. 50. P. 504.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.04.027>
14. Ali M.R.M., Uemura T., Ramadan A., Adachi K., Nemoto K., Nozawa A., Hoshino R., Abe H., Sawasaki T., Arimura G.I. The ring-type E3 ubiquitin ligase JUL1 targets the VQ-motif protein JAV1 to coordinate jasmonate signaling // *Plant Physiol.* 2019. V. 179. P. 1273.
<https://doi.org/10.1104/pp.18.00715>
15. Wasternack C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development // *Ann. Bot.* 2007. V. 100. P. 681.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcm079>
16. Hu C., Wei C., Ma Q., Dong H., Shi K., Zhou Y., Foyer C.H., Yu J. Ethylene response factors 15 and 16 trigger jasmonate biosynthesis in tomato during herbivore resistance // *Plant Physiol.* 2021. V. 185. P. 1182.
<https://doi.org/10.1093/plphys/kiaa089>
17. Liu Y., Du M., Deng L., Shen J., Fang M., Chen Q., Lu Y., Wang Q., Li C., Zhai Q. MYC2 regulates the termination of jasmonate signaling via an autoregulatory negative feedback loop // *Plant Cell*. 2019. V. 31. P. 106.
<https://doi.org/10.1105/tpc.18.00405>
18. Shi R., Yu J., Chang X., Qiao L., Liu X., Lu L. Recent advances in research into jasmonate biosynthesis and signaling pathways in agricultural crops and products // *Processes*. 2023. V. 11. P. 736.
<https://doi.org/10.3390/pr11030736>
19. Pradhan M., Pandey P., Baldwin I.T., Pandey S.P. Argonaute4 Modulates Resistance to *Fusarium brachygibbosum* Infection by regulating jasmonic acid signaling // *Plant Physiol.* 2020. V. 184. P. 1128.
<https://doi.org/10.1104/pp.20.00171>
20. Chehab E.W., Kim S., Savchenko T., Kliebenstein D., Dehesh K., Braam J. Intronic T-DNA insertion renders Arabidopsis opr3 a conditional jasmonic acid-producing mutant // *Plant Physiol.* 2011. V. 156. P. 770.
<https://doi.org/10.1104/pp.111.174169>
21. Breithaupt C., Kurzbauer R., Lilie H., Schaller A., Strassner J., Huber R., Macheroux P., Clausen T. Crystal structure of 12-oxophytodienoate reductase 3 from tomato: self-inhibition by dimerization // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2006. V. 103. P. 14337.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0606603103>
22. Zhu T., Herrfurth C., Xin M., Savchenko T., Feussner I., Goossens A., De Smet I. Warm temperature triggers JOX and ST2A-mediated jasmonate catabolism to promote plant growth // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. P. 4804.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-24883-2>
23. Pigolev A.V., Miroshnichenko D.N., Pushin A.S., Terentyev V.V., Boutanayev A.M., Dolgov S.V., Savchenko T.V. Overexpression of Arabidopsis OPR3 in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) alters plant development and freezing tolerance // *Inter. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. P. 3989.
<https://doi.org/10.3390/ijms19123989>
24. Degtyaryov E., Pigolev A., Miroshnichenko D., Frolov A., Basnet A.T., Gorbach D., Leonova T., Pushin A.S., Alekseeva V., Dolgov S., Savchenko T. 12-Oxophytodienoate reductase overexpression compromises tolerance to *Botrytis cinerea* in hexaploid and tetraploid wheat // *Plants (Basel)*. 2023. V. 12. P. 2050.
<https://doi.org/10.3390/plants12102050>
25. Tenea G.N., Bota A.P., Raposo F.C., Maquet A. Reference genes for gene expression studies in wheat flag leaves grown under different farming conditions // *BMC Research Notes*. 2011. V. 4. P. 373.
<https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-373>
26. Rowe H.C., Kliebenstein D.J. Elevated genetic variation within virulence-associated *Botrytis cinerea* polygalacturonase loci // *Molec. Plant-Microbe Interact.* 2007. V. 20. P. 1126.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-20-9-1126>
27. Savchenko T., Walley J.W., Chehab E.W., Xiao Y., Kaspi R., Pye M.F., Mohamed M.E., Lazarus C.M., Bostock R.M., Dehesh K. Arachidonic acid: an evolutionarily conserved signaling molecule modulates plant stress signaling networks // *Plant Cell*. 2010. V. 22. P. 3193.
<https://doi.org/10.1105/tpc.110.073858>
28. Hodges D.M., DeLong J.M., Forney C.F., Prange R.K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds // *Planta*. 1999. V. 207. P. 604.
<https://doi.org/10.1007/s004250050524>
29. Ngo T.T., Lenhoff H.M. A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidase and peroxidase-coupled reactions // *Analyt. Biochem.* 1980. V. 105. P. 389.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90475-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90475-3)
30. Giannopolitis C.N., Ries S.K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants // *Plant Physiol.* 1977. V. 59. P. 309.
<https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>
31. Полесская О.Г., Каширина Е.И., Алехина Н.Д. Изменение активности антиоксидантных ферментов в листьях и корнях пшеницы в зависимости от формы и дозы азота в среде // *Физиология растений*. 2004. Т. 51. С. 686.
<https://doi.org/10.1023/B:RUPP.0000040746.66725.77>
32. AbuQamar S., Moustafa K., Tran L.S. Mechanisms and strategies of plant defense against *Botrytis cinerea* // *Critical reviews in biotechnology*. 2017. V. 37. P. 262.
<https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1271767>
33. Wan S., Xin X.F. Regulation and integration of plant jasmonate signaling: a comparative view of monocot and dicot // *J. Genet. Genom. = Yi chuan xue bao*.

2022. V. 49. P. 704.
<https://doi.org/10.1016/j.jgg.2022.04.002>
34. Egusa M., Ozawa R., Takabayashi J., Otani H., Kodama M. The jasmonate signaling pathway in tomato regulates susceptibility to a toxin-dependent necrotrophic pathogen // *Planta*. 2009. V. 229. P. 965.
<https://doi.org/10.1007/s00425-009-0890-x>
 35. Li N., Han X., Feng D., Yuan D., Huang L.J. Signaling crosstalk between salicylic acid and ethylene/jasmonate in plant defense: do we understand what they are whispering? // *Inter. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 671.
<https://doi.org/10.3390/ijms20030671>
 36. Ferrari S., Plotnikova J.M., De Lorenzo G., Ausubel F.M. Arabidopsis local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4 // *Plant J.* 2003. V. 35. P. 193.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01794.x>
 37. Lorenzo O., Chico J.M., Sánchez-Serrano J.J., Solano R. JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2004. V. 16. P. 1938. <https://doi.org/10.1105/tpc.022319>
 38. Aerts N., Pereira Mendes M., Van Wees S.C.M. Multiple levels of crosstalk in hormone networks regulating plant defense // *Plant J.* 2021. V. 105. P. 489.
<https://doi.org/10.1111/tpj.15124>
 39. Zhang Y., Wang H.L., Li Z., Guo H. Genetic network between leaf senescence and plant immunity: crucial regulatory nodes and new insights // *Plants (Basel)*. 2020. V. 9. P. 495.
<https://doi.org/10.3390/plants9040495>
 40. Yuan H.M., Liu W.C., Lu Y.T. CATALASE2 coordinates SA-mediated repression of both auxin accumulation and JA biosynthesis in plant defenses // *Cell Host Microbe*. 2017. V. 21. P. 143.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.01.007>
 41. Bi K., Liang Y., Mengiste T., Sharon A. Killing softly: a roadmap of *Botrytis cinerea* pathogenicity // *Trends Plant Sci.* 2023. V. 28. P. 211.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.08.024>
 42. Wang Y., Mostafa S., Zeng W., Jin B. Function and mechanism of jasmonic acid in plant responses to abiotic and biotic stresses // *Inter. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 8568.
<https://doi.org/10.3390/ijms22168568>
 43. Ji Y., Liu J., Xing D. Low concentrations of salicylic acid delay methyl jasmonate-induced leaf senescence by up-regulating nitric oxide synthase activity // *J. Exp. Bot.* 2016. V. 67. P. 5233.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erw280>

УДК 581.1

Physcomitrium patens – МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЭВОЛЮЦИИ БЕЛКОВ С ЛЕКТИНОВЫМИ ДОМЕНАМИ У РАСТЕНИЙ¹

© 2024 г. А. Р. Агълямова^{а,*}, А. Р. Хакимова^а, О. В. Горшков^а, Т. А. Горшкова^а^аКазанский институт биохимии и биофизики Федерального исследовательского центра

“Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия

*e-mail: aliaglyamova@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.08.2023 г.

После доработки 03.10.2023 г.

Принята к публикации 04.10.2023 г.

Мох *Physcomitrium* (ранее *Physcomitrella*) *patens* (Hedw.) Mitt. — бессемянное и бессосудистое растение с расшифрованным геномом, представитель наиболее древних из ныне живущих таксонов наземных растений — удобная модель для изучения эволюционного развития растений. С целью изучения формирования набора и функций углеводов-связывающих белков у растений в ходе эволюции проведен полногеномный скрининг генов, кодирующих белки с лектиновыми доменами, в геноме *P. patens*, и проанализирована их экспрессия в различных клетках и тканях мха. Выявлен 141 ген, кодирующий белки из 15 семейств, набор и число представителей которых существенно отличались от проанализированных ранее покрытосеменных растений. У *P. patens* некоторые из белков с лектиновыми доменами обладали специфичной доменной архитектурой, не представленной у высших семенных растений. Кластеризация генов по уровню их экспрессии в различных тканях мха выявила три паттерна экспрессии генов белков с лектиновыми доменами, из которых третий кластер, представленный в клетках с концевым типом роста (в каулонеме, хлоронеме и ризоидах мха), характеризовался наибольшим количеством активно экспрессирующихся генов. Полученные результаты подтверждают идею о раннем появлении у растений генов, кодирующих лектины, и дальнейшем расширении семейств белков с лектиновыми доменами с усложнением организации растений.

Ключевые слова: *Physcomitrium patens*, лектины, транскриптом, филогения

DOI: 10.31857/S0015330324020061, EDN: OVBKHN

ВВЕДЕНИЕ

Лектины — углеводов-связывающие белки, которые являются универсальными участниками метаболизма живых организмов. Благодаря наличию доменов, способных специфически взаимодействовать с полисахаридами разнообразной структуры (т.н. лектиновых доменов), эти белки принимают участие в самых разных процессах жизнедеятельности, в которых задействованы углеводы. Многие растительные лектины являются частью различных сигнальных путей, участвуя тем самым в регуляции роста и развития растения, синтезе и деградации белков и других полимеров, реализации иммунной реакции в ответ на вторжение патогена, что делает их важными участниками процессов развития и адаптации растений [1].

Популярной моделью для изучения эволюционного развития растений является мох *Physcomitrium* (ранее *Physcomitrella*) *patens* (Hedw.) Mitt., благодаря наличию расшифрованного генома и простоте получения трансгенных растений. Несмотря на простое строение (отсутствие сосудов, настоящих корней, стеблей, листьев, цветков и семян), этот вид мха обладает многими сигнальными путями, характерными для высших сосудистых растений [2]. Мхи эволюционно представляют собой обособленную сестринскую группу по отношению к высшим семенным растениям, и потому являются эффективной моделью для отслеживания изменений в процессе эволюции наземных растений [3].

Ранее некоторые лектины *P. patens* упоминались в исследованиях, связанных с анализом разнообразия доменной организации растительных лектинов, либо с анализом эволюционного развития того или иного семейства, однако не проводилось полноценного исследования, нацеленного на характеристику всего набора генов лектинов *P. patens* [4–8]. Анализ генов, кодиру-

¹ Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: 10.31857/S0015330324020061

Сокращения: CrRLK1L — белки, подобные рецептор-подобной киназе 1 *Catharantus roseus* (от англ. *Catharantus roseus* Receptor-Like Kinase 1-like).

ющих белки с лектиновыми доменами, в геноме этого мха представляет интерес с точки зрения изучения эволюции этих белков в контексте эволюции растений.

С целью изучения различий в наборе белков с лектиновыми доменами у мха *P. patens* и высших семенных растений, мы идентифицировали в его геноме гены, кодирующие такие белки из 15 различных семейств, и провели анализ их экспрессии в различных тканях. Охарактеризована доменная организация и филогения белков с лектиновыми доменами, выявлены особенности их структурной организации. Полученные результаты обсуждаются с точки зрения эволюции лектинов с развитием и усложнением организации растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Полногеномный скрининг. Гены мха *Physcomitrium patens* (Hedw.) Mitt., кодирующие предполагаемые белки с лектиновыми доменами, были идентифицированы в базе данных растительных геномов Phytozome v13 (сборка генома *Physcomitrium patens* v3.3) по номеру характерных pfam-доменов соответствующих белков, взятых из базы данных Pfam 34.0 [9, 10]. Для семейств CRA и EUL вместо номера pfam были использованы идентификационный номер базы данных консервативных доменов NCBI или идентификационный номер базы данных PANTHER соответственно [11, 12].

Анализ доменной организации и предсказание внутриклеточной локализации. Анализ доменной организации предсказанных белков проведен на основе аминокислотных последовательностей, взятых из базы данных Phytozome v13, с использованием веб-инструмента InterProScan [13]. Белковые последовательности некоторых генов были повторно предсказаны с использованием веб-сервиса Augustus [14]. Идентифицированные белковые последовательности проверялись на наличие сигнального пептида (веб-сервис SignalP-5.0) и трансмембранного домена (веб-сервис TMHMM v2.0) [15, 16]. Предполагаемая субклеточная локализация белков с лектиновыми доменами была предсказана с использованием веб-сервисов LocTree3 и DeepLoc-1.0 [17, 18]. Полные результаты анализа представлены в табл. 1. Дополнительные материалы.

Филогенетический анализ. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей было выполнено в веб-сервисах Clustal Omega и MUSCLE [19, 20]. Белковые последовательности резуховидки Таля (*Arabidopsis thaliana*) и кукурузы (*Zea mays*), использованные в анализе, были взяты из базы данных Phytozome v13 и ранее полученных данных [10, 21]. Выровненные последовательности использовались

для построения филогенетических деревьев в программе IQ-tree 1.6.12 с использованием метода максимального правдоподобия [22]. С помощью функции ModelFinder на основе рассчитываемого Байесовского критерия подобрана наиболее подходящая модель эволюции последовательностей для построения деревьев [23]. Для определения уровня поддержки ветвей произведено 10000 итераций “сверхбыстрого бутстреп-анализа” (ultrafast bootstrap) [24]. Только деревья со значением взвешенной дистанции Робинсона-Фулдса, равной не более 4, были признаны достоверными. Визуализация и оформление полученных филогенетических деревьев осуществлялись в веб-сервисе iTOL 6.8 и программе Adobe Illustrator CC [25]. Из построенных деревьев были удалены ветки с уровнем поддержки ниже 90 с целью избежать неточности в суждениях о времени разделения и гомологичности отдельных генов. Названия генов *A. thaliana* для оформления деревьев были взяты из информационного ресурса TAIR [26].

Транскриптомный анализ. Сравнение уровня экспрессии целевых генов проводили на основе данных ДНК-микрочипов анализа различных типов тканей *P. patens*, представленных как онлайн атлас экспрессии Physcomitrella eFP Browser, где значения экспрессии, полученные на основе RMA нормализации (Robust Multi-array Average), представлены в виде MEV (Microarray Expression Values) [27]. Типы исследуемых тканей *P. patens* включают каулоному, хлороному, ризоиды, гаметофоры, архегонии, спорофиты стадий развития S1, S2, S3, SM (зрелый спорофит) и споры. Среднее значение экспрессии было рассчитано для клеток с концевым типом роста, куда вошли каулонома, хлоронома и ризоиды, а также для спорофита, куда вошли данные экспрессии всех стадий развития спорофита. Конверсию аннотации генов, кодирующих белки с лектиновыми доменами, из версии 1.6 в версию 3.3 проводили в соответствии с файлом Ppatens_318_v3.3.synonym.txt (Phytozome v13, сборка генома *P. patens* v3.3). Расчет кластеров и их визуализацию осуществляли в среде R [28].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полногеномный скрининг генов, кодирующих белки с лектиновыми доменами, в геноме мха *P. patens* выявил 141 ген, кодирующий, предположительно, белки с лектиновым доменом, принадлежащие 15 разным семействам (табл. 1). Наиболее представленными в геноме мха семействами белков с лектиновым доменом являются семейства малектин-подобных белков и LysM (табл. 1). Наименьшее количество генов обнаруживается в семействах ризин В-подобных белков и циановиринов. Из встре-

чающихся у растений семейств лектинов не было найдено генов, кодирующих амарантины, агглютинины *Agaricus bisporus* (ABA) и хитиназа-связанные агглютинины (chitinase-related agglutinins, CRA). Гены амарантинов, хоть и распространены в растительном царстве, обнаруживаются в геноме не всех растений (отсутствуют в геноме риса и *A. thaliana*) (табл. 1). Гены лектинов семейства ABA ранее были обнаружены лишь в геноме некоторых мхов, в частности, у *M. polymorpha* [6]. Гены, кодирующие CRA, трудно идентифицируются в связи с их большой схожестью с каталитически активными хитиназами и практически не выявляются при полногеномном скрининге.

В геноме *P. patens* обнаружено всего 4 гена, кодирующих белки семейства Nictaba, в то время как у высших сосудистых растений это семейство представлено несколькими десятками генов (табл. 1). У мха также найдено 6 генов, кодирующих белки с лектиновым доменом С-типа. Лектиновый домен этого семейства наиболее распространен среди животных и в геноме сосудистых растений обнаруживается в единичных количествах. При выравнивании аминокислотных последовательностей лектиновых доменов нескольких генов *P. patens*, принадлежащих этому семейству, с доменами некоторых животных белков (номера белков из базы данных Uniprot Q9UJ71, O45824, Q9Z2H6, A5PMY6)

Таблица 1. Представленность лектинов по количеству генов в разных семействах в геноме мха *Physcomitrium patens* и четырех дополнительных видов: двудольных растений – *Arabidopsis thaliana* (резуховидка Таля) и *Linum usitatissimum* (лен); однодольных растений – *Oryza sativa* (рис) и *Zea mays* (кукуруза)

Семейство	ID (Pfam/ cd/ PTHR)	<i>P. patens</i> (0.43%)	<i>A. thaliana</i> (1.2%)	<i>L. usitatissimum</i> (0.93%)	<i>O. sativa</i> (1.04%)	<i>Z. mays</i> (0.77%)
Малектин-подобные	PF12819	30	75 ^a	47	61 ^b	32
LysM	PF01476	30	12	36	20	29
GNA	PF01453	16	49	112	134	81
Геветины	PF00187	12	10	17	10	10
Legume	PF00139	10	54	72	104	51
Жакалины	PF01419	9	50	4	30 ^b	20
Кальретикулины	PF00262	7	5 ^b	8	6 ^b	11
С-тип	PF00059	6	1 ^b	2	1	1
Nictaba	PF14299	4	30	37	20	18
Галактозосвязывающие	PF02140	4	13 ^b	23	12 ^b	13
Малектины	PF11721	4	15 ^a	14	23 ^b	9
EUL	PF14200, PTHR31257	4	1	1	5	8
Галектин-подобные	PF00337	3	6 ^b	11	10 ^b	17
Рицин В	PF00652	1	2	0	4	3
Циановирины	PF08881	1	0	0	0 ^г	0
Амарантины	PF07468	0	0	19	0	4
ABA	PF07367	0	0	0	0 ^г	0
CRA	cd02879	0	9	4	2	0
Общее количество генов:		141	332	407	442	307
Основная публикация:		Данная работа	[29]	[30]	[5]	[21]

Примечание. Под видовым названием указана доля генов лектинов среди всех белок-кодирующих генов в геноме данного растения. В отдельном столбце приведены идентификационные номера доменов лектинов, взятые из баз данных PFAM, PANTHER, NCBI CDD. Основные публикации, данные которой были использованы при создании таблицы, приведены в нижней строке, данные, взятые из дополнительной литературы, обозначены следующим образом: ^a[31]; ^b[32]; ^г[33]; ^гбыстрый скрининг через pfam в Phytozome v13.

сходство последовательностей составляло около 20–30%. В отличие от семенных растений, в геноме *P. patens* был идентифицирован ген *Pp3c15_13210*, кодирующий предполагаемый белок семейства циановиринов (табл. 1).

Доменная организация белков с лектиновыми доменами у мха *P. patens*. Растительные лектины часто представляют собой химерные белки, где лектиновый домен соединен с иным белковым доменом. Доменная организация белков с лектиновыми доменами мха, в целом, напоминает белки высших растений. Доменная архитектура типа лектиновой рецептор-подобной киназы, которая является характерной особенностью лектинов растений, уже обнаруживалась у *P. patens* [34]. Также встречаются характерные комбинации лектиновых доменов с F-box-доменом (семейства Nictaba и LysM), с доменом моторного белка кинезина (семейство малектинов), с каталитическими доменами галактозил-гидролаз и галактозил-трансфераз (семейства галактоза-связывающих белков и галектин-подобных белков, соответственно). Однако некоторые комбинации лектинового домена с другими доменами, обнаруженные при анализе, на сегодняшний день не описаны у семенных растений [4, 5]. Подобные комбинации были обнаружены у белков семейств гевеинов и LysM (рис. 1). Примечательно, что представители обоих семейств относятся к хитин-связывающим белкам, потенциально вовлеченным в защиту растений.

Хитин-связывающий домен белков семейства гевеинов у высших растений, как правило, связан с доменом хитиназы классов I, II и IV (GH18, PF00182). В то же время, в геноме *P. patens* был найден ген *Pp3c6_90*, у которого была обна-

ружена комбинация домена гевеина с хитиназой классов III и V (GH18, PF00704) (рис. 1). У некоторых белков семейства гевеинов был также обнаружен другой тип доменной организации, не охарактеризованный у высших семенных растений: у трех белков хитин-связывающий лектиновый домен связан с доменом двойного пси бета-бочонка (DPBB_1, PF03330) (рис. 1). Этот домен часто встречается в составе белков пыльцевых аллергенов (в частности экспансинов), при этом сходство последовательностей экспансинов *A. thaliana* (номера белков из базы данных Uniprot Q9C554 и Q9SKU2) с гевеинами *P. patens* составляло всего около 30%. Функциональное значение комбинации хитин-связывающего домена с DPBB_1 у мха остается неясным.

Домен LysM обнаружен в комбинации с каталитическим доменом пептидазы M23 (PF01551), характерной для бактерий и обладающей гидролитической активностью по отношению к пептидогликану (рис. 1). Вероятнее всего, лектиновый домен в составе этих пептидов служит для ориентации и нацеливания фермента на пептидогликан клеточной стенки бактерий. Ген *Pp3s155_60*, помимо двух доменов LysM на С-конце, имеет также домен хитиназы класса III и V (GH18) на N-конце (рис. 1). Белки с похожей доменной организацией ранее были описаны у других споровых растений, в частности у хвоща *Equisetum arvense* [35]. Другие специфические комбинации в семействе LysM были обнаружены в белковой последовательности гена *Pp3c13_19830*, имеющей дополнительный липид-связывающий домен с N-конца (NT-C2, PF10358), у гена *Pp3c5_17160* с дополнительным доменом глутаминазы (Destabilase, PF05497) и у двух генов со

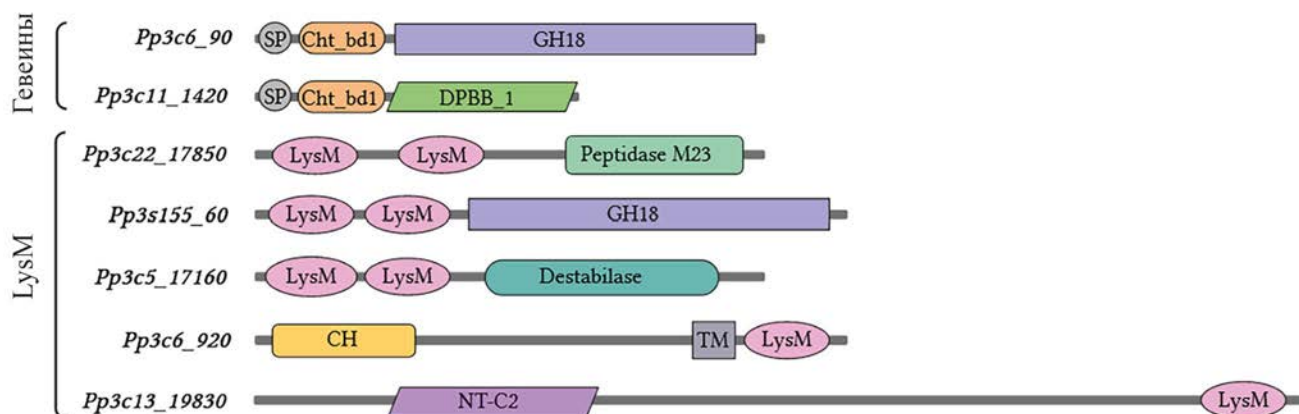


Рис. 1. Схематическое изображение специфичной доменной организации некоторых белков мха *P. patens* семейств гевеинов и LysM (номера соответствующих генов приведены слева). Во избежание путаницы названия всех доменов взяты из базы данных InterPro и поэтому приведены на английском. Обозначения: SP – сигнальный пептид; Cht_bd1 (сокращенно от chitin_bind_1) – хитин-связывающий домен гевеинов (PF00187); GH18 – домен хитиназы классов III и V (PF00704); DPBB_1 – домен двойного пси бета-бочонка (PF03330); LysM – лектиновый домен семейства LysM (PF01476); Peptidase M23 – домен пептидазы M23 (PF01551); Destabilase – домен глутаминазы (PF05497); CH – гомологичный кальпониу домен (PF00307); TM – трансмембранный домен; NT-C2 – N-концевой C2 домен (PF10358). Изображение было создано с помощью BioRender.com.

сходной аминокислотной последовательностью в Phytozome v13 (*Pp3c6_920*, *Pp3c6_900*), имеющими N-концевой гомологичный кальпониновый домен (CH, PF00307) (рис. 1). Для верификации результатов анализа доменной организации были проведены повторные предсказания аминокислотной последовательности этих генов, полученные результаты при этом были аналогичны представленным в базе данных.

Филогенетический анализ белков с лектиновыми доменами. Филогенетические деревья были построены для 9 семейств белков с лектиновым

доменом (рис. 2; рис. 1–7, Дополнительные материалы). Белки мха *P. patens* на полученных деревьях зачастую представлены отдельной кладой, более или менее обособленной от генов высших растений (*Z. mays* и *A. thaliana*), что хорошо проиллюстрировано на примере семейства жакалинов (рис. 2).

Для генов малектинов и малектин-подобных белков, ввиду схожести их последовательностей, было сконструировано общее филогенетическое дерево (рис. 1, Дополнительные материалы). Обособленной кладой здесь выделяется

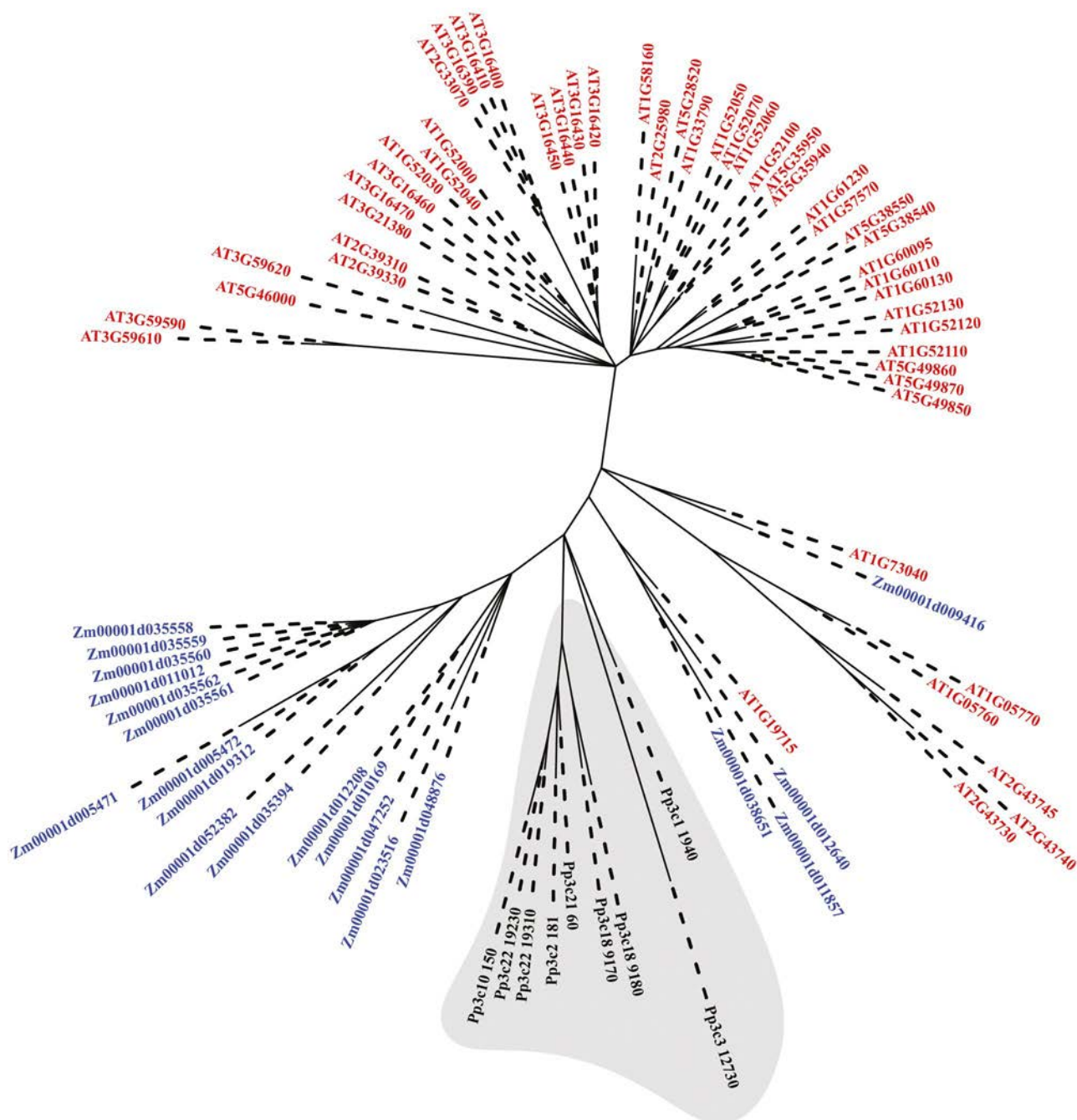


Рис. 2. Филогенетическое дерево представителей семейства жакалинов мха *P. patens*, кукурузы (*Z. mays*) и *A. thaliana*. Дистанции Робинсона-Фулда для данного дерева была равна 0. Из дерева были удалены точки ветвления с уровнем поддержки ниже 90. Серым цветом выделена обособленная клада жакалинов мха.

группа белков, подобных рецептор-подобной киназе 1 *Catharantus roseus* (CrRLK1L) (рис. 3). Эта группа включает в себя хорошо охарактеризованные рецептор-подобные киназы семейства малектин-подобных белков, в том числе белки FERONIA, HERCULES RECEPTOR KINASE 1/2, ANXUR, ANJUR и др., для которых ранее была описана роль в мониторинге и поддержании целостности клеточной стенки во время различных стадий развития растения [1, 36]. Согласно филогении, несколько малектин-подобных белков мха оказались гомологичны представителям этой группы у сосудистых растений (рис. 3).

Анализ транскриптомных данных по экспрессии генов, кодирующих белки с лектиновыми доменами, в различных тканях мха *P. patens*. Проанализированы данные по экспрессии 119 генов мха (из 141 идентифицированных) (табл. 1, Дополнительные материалы), которые представлены в опубликованном транскриптомном атласе *P. patens* [27]. Наиболее высокий уровень экспрессии отмечен для генов семейства кальре-

тикулинов — локализованных в эндоплазматическом ретикулуме молекулярных шаперонов, а также малектин-подобных белков, белков LysM и семейства С-типа (табл. 1, Дополнительные материалы) [6]. Единственный ген семейства Рицин В, предсказанный в веб-сервисах DeepLoc-1.0 и LocTree3 как секретируемый, также имел высокие значения экспрессии во всех образцах (табл. 1, Дополнительные материалы). Среди экспрессирующихся в рассматриваемых образцах генов больше всего представителей семейств малектин-подобных белков, LysM, GNA и гевеинов. Для многих из них показана выраженная дифференциальная экспрессия в различных тканях (рис. 4).

Число экспрессирующихся генов, кодирующих потенциальные лектины *P. patens*, относительно одинаковое во всех проанализированных образцах, за исключением спор, где их количество сравнительно ниже (табл. 1, Дополнительные материалы). Согласно результатам кластерного анализа, паттерн экспрессии целевых генов *P. patens*

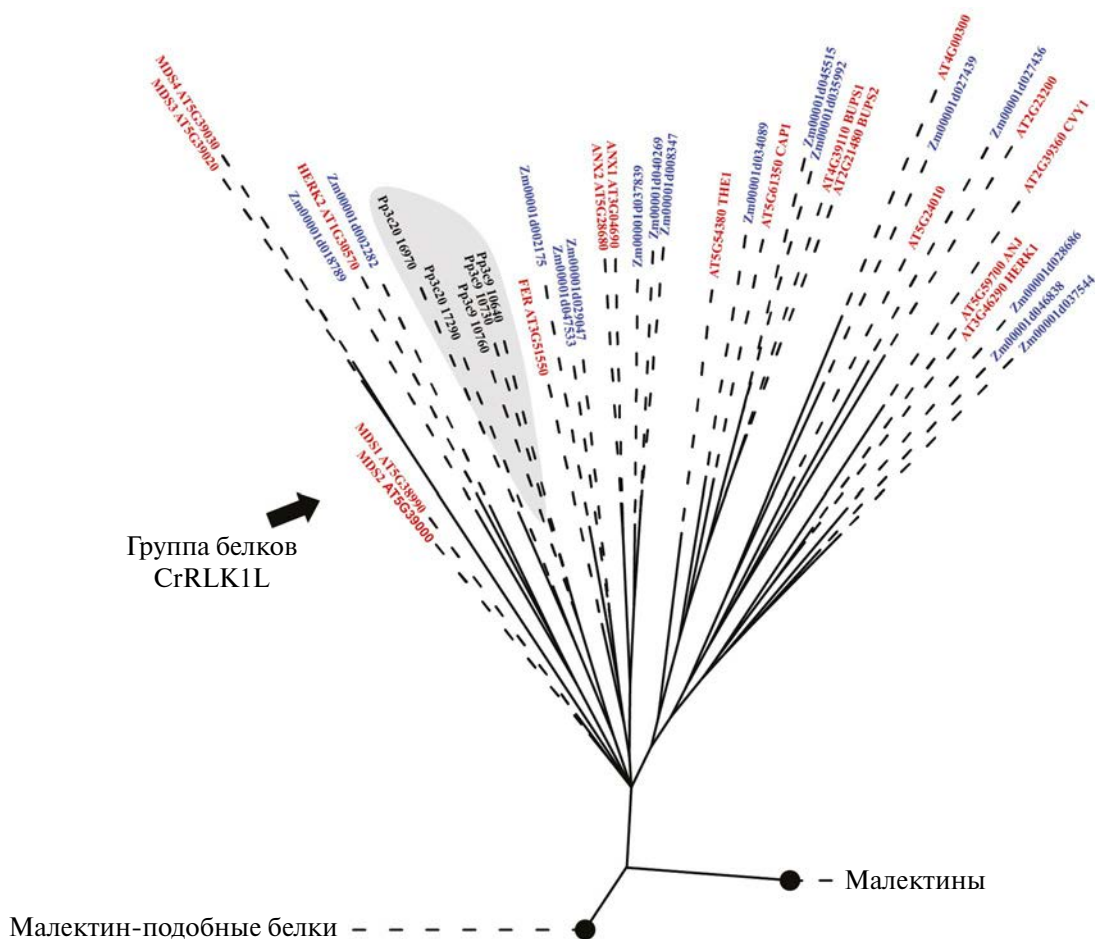


Рис. 3. Клада филогенетического дерева белков группы CrRLK1L семейства малектин-подобных белков мха *P. patens*, кукурузы (*Z. mays*) и *A. thaliana*. Для удобства визуализации другие клады малектин-подобных белков и малектинов были удалены, полное дерево представлено в Дополнительных материалах, рис. 1. Дистанция Робинсона-Фуллса для данного дерева была равна 0. Из дерева были удалены точки ветвления с уровнем поддержки ниже 90. Серым цветом дополнительно выделены клады, содержащие белки мха.

был разделен на три кластера (рис. 5). Гены первого кластера экспрессировались на относительно одинаковом уровне во всех исследуемых образцах с небольшим увеличением значений экспрессии в спорах. Наиболее представлены в этом кластере гены семейств гевеинов, LysM и малектин-подобных белков. Уровень экспрессии генов второго кластера с преобладающей долей пред-

ставителей семейства малектин-подобных белков в значительной степени повышен в гаметофорах, архегониях и на ранних стадиях развития спорофита. Самый многочисленный третий кластер (47 генов) в основном включает в себя гены семейств Legume, GNA, LysM и малектин-подобных белков, экспрессия которых повышена в клетках, удлиняющихся путем концевой роста.

Ген	Доменная организация	Субклеточная локализация (по LocTree3)	Спорофит	Споры	Каулонома	Хлоронема	Гаметофоры	Ризоиды	Архегония
Семейство малектин-подобных белков									
<i>Pr3c9_10760</i>	MLD, PK	Плазмалемма	9589	4119	11364	7697	11359	10965	11398
<i>Pr3c9_10730</i>	MLD, PK	Плазмалемма	5074	2465	9847	6334	8937	14998	6677
<i>Pr3c9_10640</i>	MLD, PK	Плазмалемма	5085	2622	8060	5487	8176	11271	6527
<i>Pr3c20_16970</i>	MLD, PK	Плазмалемма	346	623	1132	518	414	1752	364
<i>Pr3c20_17290</i>	MLD, PK	Плазмалемма	3273	2648	5374	3143	4139	2035	3090
<i>Pr3c4_2350</i>	MLD, LRR, PK	Плазмалемма	5422	707	283	677	16664	4115	7723
<i>Pr3c4_18780</i>	MLD, LRR, PK	Плазмалемма	424	1353	6567	7000	4420	6241	4112
<i>Pr3c3_28930</i>	MLD, LRR, PK	Плазмалемма	4461	15	243	287	3343	14	8518
<i>Pr3c16_5720</i>	MLD, LRR	Цитоплазма	2697	858	5548	1932	2866	1728	3428
<i>Pr3c2_37290</i>	MLD, LRR	Мембрана ЭПР	1138	10096	7484	1998	917	1730	646
<i>Pr3c9_5240</i>	MLD, LRR	Внеклеточная	2923	2733	3808	1352	1169	1600	1221
<i>Pr3c9_7920</i>	MLD, LRR	Внеклеточная	3293	18	16	303	3318	245	5125
<i>Pr3c4_18360</i>	MLD, LRR, PK	Плазмалемма	905	21	3745	3656	783	3259	1037
<i>Pr3c7_20780</i>	MLD, LRR	Ядро	984	885	5647	1455	419	2540	1404
<i>Pr3c3_10220</i>	MLD, LRR	Плазмалемма	1377	18	5070	3857	233	610	59
<i>Pr3c1_9180</i>	MLD, LRR, PK	Плазмалемма	335	1558	1224	2001	573	1261	317
<i>Pr3c15_1540</i>	MLD, LRR, PK	Плазмалемма	140	262	1659	1462	930	1732	410
<i>Pr3c27_5920</i>	MLD, LRR	Плазмалемма	890	14	549	104	1263	32	1437
<i>Pr3c3_25390</i>	MLD, LRR, PK	Плазмалемма	1202	40	84	443	512	369	160
<i>Pr3c12_16180</i>	MLD, LRR, PK	Плазмалемма	853	9	32	317	613	389	235
<i>Pr3c1_23040</i>	MLD, LRR, PK	Плазмалемма	285	2353	41	76	30	1153	95
<i>Pr3c15_3950</i>	MLD, LRR	Плазмалемма	647	171	328	318	416	254	465
<i>Pr3c7_25750</i>	MLD, LRR, PK	Плазмалемма	255	1115	358	957	175	132	121
<i>Pr3c1_23020</i>	MLD, LRR, PK	Плазмалемма	235	1877	45	102	54	287	112
<i>Pr3c13_11270</i>	MLD, LRR	Плазмалемма	23	13	2354	118	52	18	10
<i>Pr3c2_18520</i>	MLD, PK	Плазмалемма	52	135	698	282	354	306	247
<i>Pr3c26_12890</i>	MLD, LRR	Плазмалемма	91	44	604	303	38	553	33
<i>Pr3c10_2160</i>	MLD	Внеклеточная	11	21	12	13	10	22	12
Семейство Nictaba									
<i>Pr3c19_22630</i>	F-box, PP2	Ядро	9305	7455	5881	6580	7165	4547	7837
<i>Pr3c24_14280</i>	F-box, PP2	Цитоплазма	1955	1507	3939	699	2236	4290	615
<i>Pr3c16_11450</i>	F-box, PP2	Хлоропласт	1505	7482	7394	4797	2638	1869	1358
<i>Pr3c26_1510</i>	PP2	Хлоропласт	277	29	3738	158	143	40	29
Гевеины со специфической доменной организацией									
<i>Pr3c6_90</i>	Chitin_bind_1, GH18	Вакуоль	9750	35	1045	525	2711	19	4285
<i>Pr3c11_1420</i>	Chitin_bind_1, DPBB_1	Вакуоль	879	182	42	70	49	115	123
<i>Pr3c7_25120</i>	Chitin_bind_1, DPBB_1	Вакуоль	101	2038	43	33	35	63	75
Белки семейства LysM со специфической доменной организацией									
<i>Pr3c13_19830</i>	NT-C2, LysM	Ядро	912	42	369	955	1413	611	705
<i>Pr3c6_920</i>	CH, LysM	Цитоплазма	1041	789	403	1435	2039	1992	452
<i>Pr3c1_33030</i>	LysM, LysM, Peptidase_M23	Цитоплазма	4493	3577	10181	7853	2476	6482	4581
<i>Pr3c1_21480</i>	LysM, LysM, Peptidase_M23	Цитоплазма	792	22	3804	477	668	799	110
<i>Pr3c21_17920</i>	LysM, LysM, LysM, Peptidase_M23	Хлоропласт	2114	3643	4030	6612	5082	3266	3168
<i>Pr3c5_17160</i>	LysM, LysM, Destabilase	Хлоропласт	1851	1089	4162	5421	3647	4630	956
<i>Pr3c2_19990</i>	LysM, LysM, Peptidase_M23	Цитоплазма	214	22	1729	505	394	683	224

Рис. 4. Экспрессия генов мха *P. patens*, кодирующих белки семейств малектин-подобных белков и Nictaba, а также отдельных представителей семейств гевеинов и LysM со специфической доменной организацией. Представлена их экспрессия в различных типах тканей *P. patens* (по данным [27]). Для спорофита указано среднее значение экспрессии для всех стадий развития спорофита. Приведена доменная организация и предсказанная *in silico* субклеточная локализация белков.

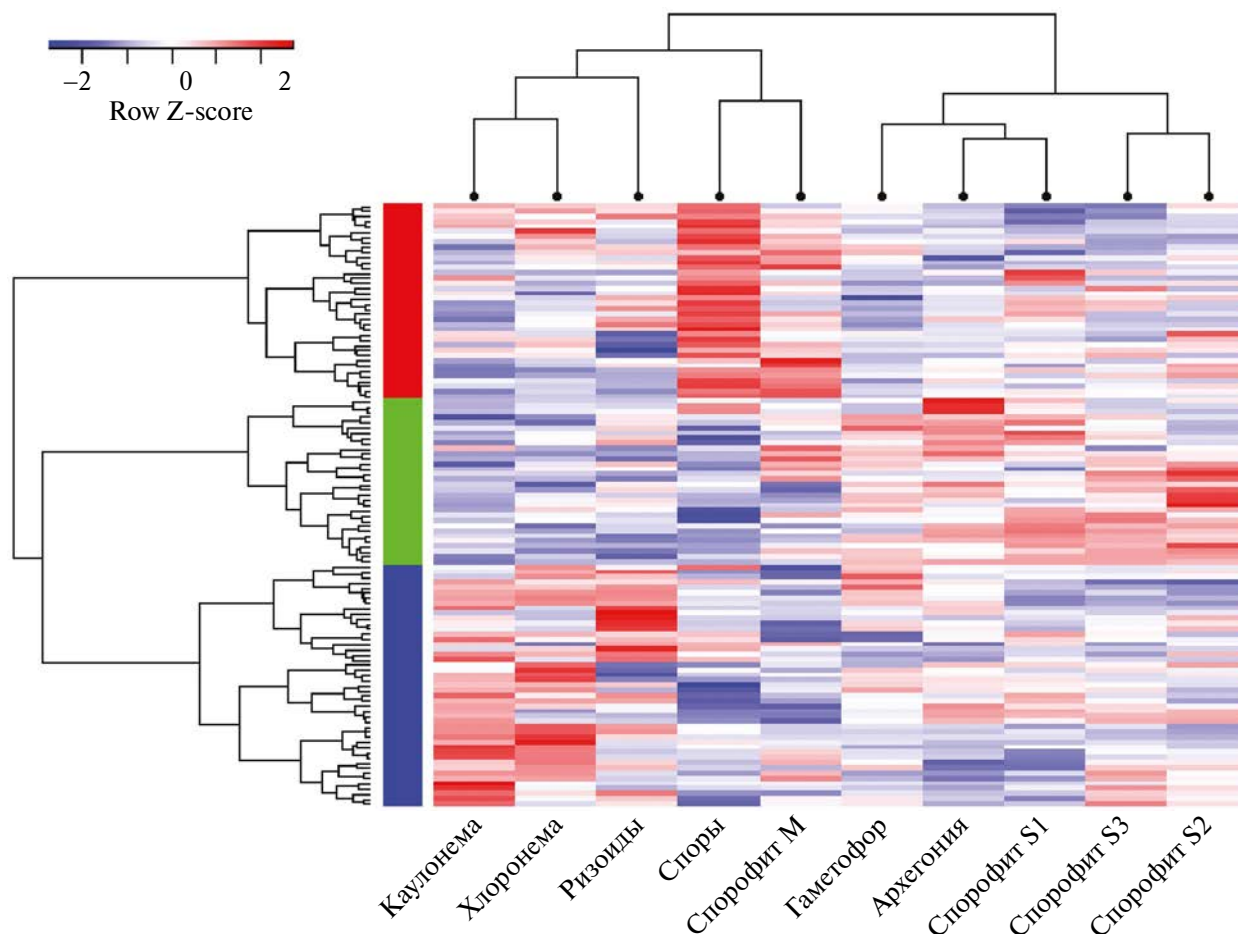


Рис. 5. Результаты иерархического кластерного анализа и тепловая карта уровней экспрессии генов, кодирующих белки с лектиновыми доменами в различных типах тканей мха *P. patens*. Тепловая карта отражает относительный уровень экспрессии каждого гена (строки) в каждом образце (ряды). Уровень экспрессии в кластерах представлен в виде трансформированного в Z-score логарифмированного значения экспрессии (цветовая шкала в верхнем левом углу рисунка). Три выявленных кластера отображены в левой части в виде вертикальных прямоугольников (красный, зеленый, синий).

ОБСУЖДЕНИЕ

Нами был проведен полногеномный скрининг генов, кодирующих белки с углевод-связывающими лектиновыми доменами в геноме модельного спорового растения — *P. patens*. При сравнении представленности генов лектинов в геноме мха с геномами некоторых сосудистых растений было выявлено, что количество генов, кодирующих белки с лектиновыми доменами, у мха в 2 раза меньше, чем у сосудистых. Доля генов лектинов среди всех белок-кодирующих генов в геноме сосудистых растений составляет примерно 1%, тогда как у *P. patens* — всего 0.43%. Хорошо известно, что многие белки с лектиновыми доменами так или иначе вовлечены в защитные реакции организма растения против абиотических (засуха, засоление и др.) и биотических стрессовых факторов (поражение патогенными бактериями, грибами, насекомыми) [1]. Вероятно, в процессе эволюции у растений в ответ на изменяющиеся условия

окружающей среды и усложнения организации сигнальных систем количество генов, кодирующих лектины, увеличилось в несколько раз.

У *P. patens* наблюдались отличия в представленности различных семейств белков с лектиновыми доменами. Наряду с малектин-подобными белками, наиболее представленные семейства лектинов у сосудистых растений — семейства GNA и Legume, в то время как у мха *P. patens* наиболее обширны семейства малектин-подобных белков и LysM (табл. 1). Белки семейств Legume и GNA по большей части представляют собой рецептор-подобные киназы и рецептор-подобные белки, локализованные в плазмалемме. Как правило, это гены, экспрессия которых в обычных условиях остается низкой и повышается в условиях стресса. Они вовлечены в процессы взаимодействия растений с различными микроорганизмами, включая симбиоз и защитные реакции в ответ на атаку патогена [34]. В целом, доля генов, кодирующих рецептор-подоб-

ные киназы с лектиновыми доменами, от генов всех белков с лектиновыми доменами у *P. patens* ниже (около 1/3), чем у высших растений (1/2) (табл. 1, Дополнительные материалы).

Рецептор-подобные киназы с лектиновыми доменами в последние десять лет заслужили особое внимание со стороны научного общества в связи с их участием в различных сигнальных путях и способностью к восприятию разнообразных внеклеточных сигналов, включая микроб-ассоциированные, патоген-ассоциированные и дистресс-ассоциированные молекулярные паттерны [34, 37]. Помимо этого, предполагается, что углевод-связывающие домены некоторых подобных белков способны непосредственно взаимодействовать с углеводами клеточной стенки. Другими словами, предполагается их роль в восприятии и мониторинге состояния клеточной стенки в процессе жизнедеятельности растений [38]. Доля белков *P. patens*, которые потенциально способны взаимодействовать с углеводами клеточной стенки (мембраносвязанные белки с внеклеточным лектиновым доменом и непосредственно белки клеточной стенки) составила около 65%, тогда как у высших растений это число достигает 80% и выше (табл. 1, Дополнительные материалы).

Состав клеточной стенки *P. patens* существенно отличается от клеточной стенки покрытосеменных растений: помимо целлюлозы, основной его структурный компонент – маннаны [39]. Потому набор углевод-связывающих белков (лектинов) у этого мха может также иметь свои особенности. Однако основные семейства маннозосвязывающих лектинов – GNA и жакалины либо количественно менее представлены, либо сравнимы по числу представителей с покрытосеменными растениями. Для белков семейств С-типа, циановиринов и EUL была также показана возможная специфичность по отношению к высокоманнозным N-гликанам, но предполагается, что эти лектины взаимодействуют с различными гликопротеинами [6].

Растительные лектины С-типа представляют собой рецептор-подобные киназы, локализованные на плазмалемме. У *P. patens* также обнаруживаются белки С-типа с лейциновыми повторами, предсказанные в веб-сервисе LocTree3 как секретируемые белки. Это семейство было хорошо охарактеризовано у животных, однако на сегодняшний день остается мало изученным у растений [40]. Циановирины, в основном, характерны для грибов, однако присутствуют у некоторых низших и высших споровых растений и полностью отсутствуют в геноме семенных растений. Сходный белок, выделенный из цианобактерий, показал специфичность по отношению к высокоманнозным N-гликанам на поверхности гликопротеина ви-

руса иммунодефицита человека [6]. Ген *P. patens* *Pp3c15_13210* кодирует белок, предсказанный веб-сервисами DeepLoc-1.0 и LocTree3 как белок клеточной стенки, его функция неясна, экспрессия гена практически отсутствует в проанализированных образцах (табл. 1, Дополнительные материалы).

Семейство Nictaba у *P. patens* представлено всего 4 генами. Некоторые белки этого семейства также известны как PP2 (Phloem Protein 2) и представляют собой структурные компоненты проводящей ткани высших сосудистых растений. Проводящие элементы мхов, выполняющие аналогичную функцию, структурно отличаются от флоэмы [41]. Вероятнее всего, у более низкоорганизованных растений белки Nictaba не обладают схожей функциональной активностью и, по всей видимости, это семейство белков с лектиновым доменом получило расширение вместе с развитием проводящих тканей у сосудистых растений. Три гена Nictaba, имеющие дополнительный домен F-box (считается, что он участвует в убиквитинировании), конститутивно экспрессируются во всех проанализированных частях растений, тогда как экспрессия гена с исключительно лектиновым доменом (*Pp3c26_1510*) наиболее выражена в каулонеме [42].

Филогенетический анализ белков, кодируемых искомыми генами, показал наличие существенных различий в белковых последовательностях проанализированных организмов (спорового растения мха *P. patens* и покрытосеменных растений *A. thaliana* и *Z. mays*) – в большинстве случаев белки мха локализовались в обособленной кладе. При этом, на примере семейства жакалинов можно заметить, что белки мха филогенетически ближе к белкам однодольных растений (кукурузы) (рис. 2). Семейство жакалинов состоит из разнообразных белков химерной структуры, и доменная организация белков однодольных и двудольных имеет существенные отличия. Действительно, доменная организация белков жакалинов мха ближе к жакалинам однодольных, среди которых также, к примеру, часто встречается комбинация домена жакалина с киназным доменом; у двудольных такая комбинация доменов не выявлена. Роль этих белков в растительной клетке до сих пор не выяснена, и также неясно, могут ли они выполнять схожие функции у таких разных групп растений, как мхи и однодольные.

Пять белков семейства малектин-подобных *P. patens* оказались гомологичны белкам CrRLK1L *A. thaliana* (рис. 3). Эта группа рецептор-подобных киназ относительно хорошо охарактеризована у *A. thaliana*. Известными лигандами белков CrRLK1L являются короткие

внеклеточные пептиды RALF (rapid alkalization factor — фактор быстрого ощелачивания). За счет взаимодействия со своим пептидным лигандом, эти рецепторы опосредуют передачу сигналов и регуляцию разнообразных процессов развития растения, морфогенеза, размножения, иммунного ответа и реакции на стресс [1]. Отдельные представители этого семейства у *A. thaliana* были также охарактеризованы как участники регуляции и поддержания целостности клеточной стенки [36]. Количество генов, кодирующих CrRLK1L у *P. patens* многократно меньше, чем у *A. thaliana* и кукурузы (рис. 3). Вероятно, механизм поддержания целостности клеточной стенки у исследуемого мха развит слабо, что может быть связано с отличиями в наборе полисахаридов клеточной стенки у мхов и сосудистых растений. Характерным полисахаридом клеточной стенки у эволюционно ранних таксонов растений является маннан, составляющий основу всех клеточных стенок во всем организме [39, 43]. С усложнением организации растений и увеличением разнообразия полисахаридов клеточной стенки — потенциальных углеводных лигандов белков с лектиновыми доменами, количество членов этого семейства у высших растений значительно увеличилось.

У *P. patens* гены белков с лектиновыми доменами активно экспрессируются во всех частях растения, что подчеркивает важность их функционирования для обеспечения жизнедеятельности клеток. Экспрессия индивидуальных генов часто дифференциальна; выявлено три основных паттерна экспрессии (рис. 4). По количеству экспрессирующихся генов выделяются семейства малектин-подобных белков, LysM, GNA и гевеины. Среди них малектин-подобные белки представляют собой по большей части мембранные белки, вовлеченные в регуляцию самых разных процессов жизнедеятельности растений. Семейства LysM и гевеины, как лектины со специфичностью к олигомерам хитина, участвуют в иммунных ответах. Семейство GNA слабо изучено, однако также часто рассматривается как часть системы защиты растения от биотического и абиотического стресса [37]. Наиболее активная экспрессия этих лектинов наблюдается в кластере, включающем каулоному, хлоронему и ризоиды (рис. 4; табл. 1, Дополнительные материалы). Эти филаментные образования растут концевым ростом, соответственно, для них характерны активные перестройки клеточной стенки и формирование дополнительной поверхности контакта с внешней средой [44]. Это служит аргументом в пользу того, что уже на ранних этапах эволюции наземных растений лектины могли участвовать как компоненты сигнальных систем, задействованных в мониторинге состояния клеточной стенки и в реакциях

на биотические и абиотические факторы внешней среды.

Лектины возникли рано в процессе эволюции живых организмов. С развитием растений и усложнением их организации семейства растительных лектинов расширялись и, вероятно, обретали новые функции. При этом у мхов отмечается характерная только для них доменная организация белков с лектиновыми доменами. Наблюдаются некоторые различия в доменной организации белков мха и высших семенных растений, в частности, в группе белков, потенциально вовлеченных в реализацию иммунного ответа растений (например, семейство гевеинов и LysM). Хотя набор семейств белков с лектиновыми доменами у мха практически не отличается от представленных в геномах высших семенных растений, относительная доля генов, кодирующих лектины, в геноме *P. patens* существенно меньше (табл. 1). Увеличение числа белков с лектиновыми доменами в ходе эволюции может свидетельствовать о выполнении ими более специализированных функций у высших сосудистых растений.

Несмотря на то, что углевод-связывающая активность (по крайней мере, в отношении гликозилированных белков) и функции некоторых растительных лектинов достаточно хорошо описаны, остается неясным, имеют ли похожие функции белки мха. Из-за методических сложностей пока не охарактеризованы полисахаридные лиганды многочисленных белков с лектиновыми доменами, локализованных в клеточной стенке, в которой у растений сконцентрировано огромное разнообразие углеводных структур. Дальнейшее изучение этих белков может стать важным шагом в изучении эволюции наземных растений.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-64-47036) (сопоставление с лектинами высших растений), а также Государственного задания Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук” (идентификация в геноме, филогения, анализ экспрессии).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Coninck T., Van Damme E.J.M. The multiple roles of plant lectins // Plant Sci. 2021. V. 313. P. 111096. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.111096>
2. Cove D.J., Perroud P.F., Charron A.J., McDaniel S.F., Khandelwal A., Quatrano R.S. The moss *Physcomitrella patens*: a novel model system for plant development

- and genomic studies // Cold Spring Harb. Protoc. 2009. V. 2009.pdb.emo115.
<https://doi.org/10.1101/pdb.emo115>
3. *Rensing S.A., Lang D., Zimmer A.D., Terry A., Salamov A., Shapiro H., Nishiyama T., Perroud P.F., Lindquist E.A., Kamisugi Y., Tanahashi T., Sakakibara K., Fujita T., Oishi K., Shin-I T. et al.* The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants // Science. 2008. V. 319. P. 64.
<https://doi.org/10.1126/science.1150646>
4. *Van Holle S., Van Damme E.J.M.* Messages from the past: new insights in plant lectin evolution // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. P. 36.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00036>
5. *Van Holle S., De Schutter K., Eggermont L., Tsaneva M., Dang L., Van Damme E.J.M.* Comparative study of lectin domains in model species: new insights into evolutionary dynamics // Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18. P. 1136.
<https://doi.org/10.3390/ijms18061136>
6. *Van Damme E.J.M., Lannoo N., Peumans W.J.* Plant lectins // Adv. Bot. Res. 2008. V. 48. P. 107.
[https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)00403-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)00403-5)
7. *Dinant S., Clark A.M., Zhu Y., Vilaine F., Palauqui J.C., Kusiak C., Thompson G.A.* Diversity of the superfamily of phloem lectins (phloem protein 2) in angiosperms // Plant Physiol. 2003. V. 131. P. 114.
<https://doi.org/10.1104/pp.013086>
8. *Fouquaert E., Peumans W.J., Vandekerckhove T., Onghenaert M., Van Damme E.J.* Proteins with an Eucalyptus lectin-like domain are ubiquitous in Embryophyta // BMC Plant Biol. 2009. V. 9. P. 136.
<https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-136>
9. *Lang D., Ullrich K.K., Murat F., Fuchs J., Jenkins J., Haas F.B., Piednoel M., Gundlach H., Van Bel M., Meyberg R., Vives C., Morata J., Symeonidi A., Hiss M., Muchero W. et al.* The *Physcomitrella patens* chromosome-scale assembly reveals moss genome structure and evolution // Plant J. 2018. V. 93. P. 515.
<https://doi.org/10.1111/tpj.13801>
10. *Goodstein D.M., Shu S., Howson R., Neupane R., Hayes R.D., Fazo J., Mitros T., Dirks W., Hellsten U., Putnam N., Rokhsar D.S.* Phytozome: a comparative platform for green plant genomics // Nucleic Acids Res. 2012. V. 40. P. D1178.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr944>
11. *Wang J., Chitsaz F., Derbyshire M.K., Gonzales N.R., Gwatz M., Lu S., Marchler G.H., Song J.S., Tanaki N., Yamashita R.A., Yang M., Zhang D., Zheng C., Lanczycki C.J., Marchler-Bauer A.* The conserved domain database in 2023 // Nucleic Acids Res. 2022. V. 51. P. D384.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkac1096>
12. *Thomas P.D., Ebert D., Muruganujan A., Mushayaha T., Albou L.P., Mi H.* PANTHER: making genome-scale phylogenetics accessible to all // Protein Sci. 2022. V. 31. P. 8.
<https://doi.org/10.1002/pro.4218>
13. *Blum M., Chang H.Y., Chuguransky S., Grego T., Kandasaamy S., Mitchell A., Nuka G., Paysan-Lafosse T., Qureshi M., Raj S., Richardson L., Salazar G.A., Williams L., Bork P., Bridge A.* The InterPro protein families and domains database: 20 years on // Nucleic Acids Res. 2021. V. 49. P. D344.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa977>
14. *Keller O., Kollmar M., Stanke M., Waack S.* A novel hybrid gene prediction method employing protein multiple sequence alignments // Bioinformatics. 2011. V. 27. P. 757.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr010>
15. *Almagro Armenteros J.J., Tsirigos K.D., Sønderby C.K., Petersen T.N., Winther O., Brunak S., von Heijne G., Nielsen H.* SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks // Nat. Biotechnol. 2019. V. 37. P. 423.
<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>
16. *Krogh A., Larsson B., Von Heijne G., Sonnhammer E.L.* Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes // J. Mol. Biol. 2001. V. 305. P. 567.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>
17. *Goldberg T., Hecht M., Hamp T., Karl T., Yachdav G., Ahmed N., Altermann U., Angerer P., Ansorge S., Balasz K., Bernhofer M., Betz A., Cizmadija L., Do K.T., Gerke J.* LocTree3 prediction of localization // Nucleic Acids Res. 2014. V. 42. P. W350.
<https://doi.org/10.1093/nar/gku396>
18. *Almagro Armenteros J.J., Sønderby C.K., Sønderby S.K., Nielsen H., Winther O.* DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning // Bioinformatics. 2017. V. 33. P. 3387.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx431>
19. *Madeira F., Park Y.M., Lee J., Buso N., Gur T., Madhusoodanan N., Basutkar P., Tivey A.R.N., Potter S.C., Finn R.D., Lopez R.* The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019 // Nucleic Acids Res. 2019. V. 47. P. W636.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>
20. *Edgar R.C.* MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // Nucleic Acids Res. 2004. V. 32. P. 1792.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
21. *Aglyamova A., Petrova N., Gorshkov O., Kozlova L., Gorshkova T.* Growing maize root: lectins involved in consecutive stages of cell development // Plants. 2022. V. 11. P. 1799.
<https://doi.org/10.3390/plants11141799>
22. *Nguyen L.T., Schmidt H.A., Von Haeseler A., Minh B.Q.* IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies // Mol. Biol. Evol. 2015. V. 32. P. 268.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
23. *Kalyaanamoorthy S., Min B.Q., Wong T.K., Von Haeseler A., Jermiin L.S.* ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates // Nat. Methods. 2017. V. 14. P. 587.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
24. *Minh B.Q., Nguyen M.A.T., Von Haeseler A.* Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap // Mol.

- Biol. Evol. 2013. V. 30. P. 1188.
<https://doi.org/10.1093/molbev/mst024>
25. Letunic I., Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation // Nucleic Acids Res. 2021. V. 49. P. W293.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
 26. Garcia-Hernandez M., Berardini T., Chen G., Crist D., Doyle A., Huala E., Knee E., Lambrecht M., Miller N., Mueller L.A., Mundodi S., Reiser L., Rhee S.Y., Scholl R., Tacklind J. TAIR: a resource for integrated *Arabidopsis* data // Funct. Integr. Genomics. 2002. V. 2. P. 239.
<https://doi.org/10.1007/s10142-002-0077-z>
 27. Ortiz-Ramírez C., Hernandez-Coronado M., Thamm A., Catarino B., Wang M., Dolan L., Feijó J.A., Becker J.D. A transcriptome atlas of *Physcomitrella patens* provides insights into the evolution and development of land plants // Mol. Plant. 2016. V. 9. P. 205.
<http://dx.doi.org/10.1016%2Fj.molp.2015.12.002>
 28. R Development Core Team (2014). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>
 29. Eggermont L., Verstraeten B., Van Damme E.J.M. Genome-wide screening for lectin motifs in *Arabidopsis thaliana* // The plant genome. 2017. V. 10. plantgenome2017.02.0010.
<https://doi.org/10.3835/plantgenome2017.02.0010>
 30. Petrova N., Nazipova A., Gorshkov O., Mokshina N., Patova O., Gorshkova T. Gene expression patterns for proteins with lectin domains in flax stem tissues are related to deposition of distinct cell wall types // Front. Plant Sci. 2021. V. 12. P. 634594.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.634594>
 31. Yang H., Wang D., Guo L., Pan H., Yvon R., Garman S., Wu H., Cheung A.Y. Malectin/Malectin-like domain-containing proteins: a repertoire of cell surface molecules with broad functional potential // Cell Surf. 2021. V. 7. P. 100056.
<https://doi.org/10.1016/j.tcs.2021.100056>
 32. Jiang S.Y., Ma Z., Ramachandran S. Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants // BMC Evol. Biol. 2010. V. 10. P. 1.
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-79>
 33. Jing X.Q., Shalmani A., Zhou M.R., Shi P.T., Muhammad I., Shi Y., Sharif R., Li W., Liu W., Chen K.M. Genome-wide identification of malectin/malectin-like domain containing protein family genes in rice and their expression regulation under various hormones, abiotic stresses, and heavy metal treatments // J. Plant Growth Regul. 2020. V. 39. P. 492.
<https://doi.org/10.1007/s00344-019-09997-8>
 34. Bellande K., Bono J.J., Savelli B., Jamet E., Canut H. Plant lectins and lectin receptor-like kinases: how do they sense the outside? // Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18. P. 1164.
<https://doi.org/10.3390/ijms18061164>
 35. Inamine S., Onaga S., Ohnuma T., Fukamizo T., Taira T. Purification, cDNA cloning, and characterization of LysM-containing plant chitinase from horsetail (*Equisetum arvense*) // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2015. V. 79. P. 1296.
<https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1025693>
 36. Franck C.M., Westermann J., Boisson-Dernier A. Plant malectin-like receptor kinases: from cell wall integrity to immunity and beyond // Annu. Rev. Plant Biol. 2018. V. 69. P. 301.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040557>
 37. De Coninck T., Van Damme E.J.M. Plant lectins: handymen at the cell surface // Cell Surf. 2022. V. 8. P. 100091.
<https://doi.org/10.1016/j.tcs.2022.100091>
 38. Ji D., Chen T., Zhang Z., Li B., Tian S. Versatile roles of the receptor-like kinase *feronia* in plant growth, development and host-pathogen interaction // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 7881.
<https://doi.org/10.3390/ijms21217881>
 39. Popper Z.A., Fry S.C. Primary cell wall composition of bryophytes and charophytes // Ann. Bot. 2003. V. 91. P. 1.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcg013>
 40. Mayer S., Raulf M.K., Lepenies B. C-type lectins: their network and roles in pathogen recognition and immunity // Histochem. Cell Biol. 2017. V. 147. P. 223.
<https://doi.org/10.1007/s00418-016-1523-7>
 41. Ligrone R., Duckett J.G., Renzaglia K.S. Conducting tissues and phyletic relationships of bryophytes // Philos. Trans. R. Soc. 2000. V. 355. P. 795.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0616>
 42. Stefanowicz K., Lannoo N., Van Damme E.J.M. Plant F-box proteins—judges between life and death // Crit. Rev. Plant Sci. 2015. V. 34. P. 523.
<https://doi.org/10.1080/07352689.2015.1024566>
 43. Ye Z.H., Zhong R. Cell wall biology of the moss *Physcomitrium patens* // J. Exp. Bot. 2022. V. 73. P. 4440.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erac122>
 44. Vidali L., Bezanilla M. *Physcomitrella patens*: a model for tip cell growth and differentiation // Curr. Opin. Plant Biol. 2012. V. 15. P. 625.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.09.008>

УДК 581.1

БИОХИМИЧЕСКАЯ, ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И ЦИФРОВАЯ ОЦЕНКА ЗЕРНА СОРТОВ ОЗИМОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С РАЗЛИЧНЫМ ИНДЕКСОМ ПРОРАСТАНИЯ¹

© 2024 г. А. В. Федяева^{a, b, *}, С. Д. Афонникова^{a, c, d}, Д. А. Афонников^{a, c}, О. Г. Смирнова^{a, c},
В. Н. Деева^e, А. И. Прянишников^f, Е. А. Салина^{a, c}

^aФедеральное государственное бюджетное учреждение науки “Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”, Новосибирск, Россия

^bФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

^cКурчатовский геномный центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

^dНовосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

^eОбщество с ограниченной ответственностью “Научно-производственное объединение «Бетагран Семена»”, Москва, Россия

^fДепартамент селекции и семеноводства сельскохозяйственных культур, Акционерное общество “Щелково Агрохим”, Щелково, Россия

*e-mail: fedyaeva.anna@mail.ru

Поступила в редакцию 23.08.2023 г.

После доработки 18.10.2023 г.

Принята к публикации 30.10.2023 г.

Устойчивость к прорастанию зерна на корню (ПЗНК) является хозяйственно важным признаком, который влияет на качество зерна и урожайность пшеницы. Данная устойчивость зависит как от факторов окружающей среды, так и от генотипических и фенотипических особенностей сортов пшеницы. Известно, что краснозерные сорта пшеницы являются более устойчивыми к ПЗНК, чем белозерные. Однако в настоящее время не существует подходов, позволяющих однозначно различать краснозерные сорта пшеницы по степени устойчивости к ПЗНК. Целью настоящей работы являлось сравнение различных подходов для эффективной дифференцировки сортов озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) по устойчивости к ПЗНК. У 164 сортов озимой мягкой пшеницы, среди которых 156 были краснозерными, были определены индекс прорастания (ИП), активность α -амилазы (ААА), проведена цифровая и генетическая оценка уровня красной окраски зерновки. Исследования проводили на стадиях молочно-восковой спелости (М/ВС) и полного созревания (ПС) зерна. Исходя из динамики изменения ИП на стадиях М/ВС и ПС зерна установлено, что наиболее целесообразно проводить оценку ИП на стадии М/ВС зерна. Анализ ААА был проведен с использованием метода Церальфа и определения числа падения (ЧП). Показано повышение уровня ААА в процессе созревания зерна у изученных сортов. Была выявлена отрицательная корреляционная связь между ИП и ЧП, ЧП и ААА. Использование цветовой модели Lab для оценки окраски оболочки зерна позволило выделить 3 типа окраски зерна. Изучены аллельные варианты гена *Tamylb10*, контролирующего красную окраску зерна. Анализ цифровой оценки окраски зерна и аллельного состава генов *Tamylb10* не выявил дополнительного к ИП и ЧП критерия, который можно было бы использовать для разделения краснозерных сортов пшеницы по устойчивости к ПЗНК. В то же время показано, что наиболее многочисленная группа из изученных сортов, имеет от двух и более доминантных генов, контролирующих красную окраску зерна. В целом, сравнение краснозерных сортов по всем трем параметрам позволило выделить группу сортов, наиболее устойчивых к ПЗНК. В эту группу вошли 73 краснозерных сорта мягкой пшеницы из 156 изученных, при этом белозерных сортов, устойчивых к ПЗНК, выявлено не было.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, α -амилаза, ген *Tamylb10*, индекс прорастания, озимая мягкая пшеница, окраска зерна, прорастание зерна, число падения

DOI: 10.31857/S0015330324020072, EDN: OBFMEG

¹ Дополнительные материалы размещены в электронном виде по
DOI статьи: 10.31857/S0015330324020072

ВВЕДЕНИЕ

Прорастание зерна на корню (ПЗНК) приводит к снижению качества и количества урожая зерновых культур [1]. Прорастание зерна в колосе на родительском растении происходит после его созревания. На данное явление оказывает влияние комплекс факторов, таких как, поздний сбор урожая, дождливая погода, пониженные температуры, фенотип и восприимчивость сорта [1]. Известно, что морфологические особенности строения колоса, восковой налет, опушенность, остистость, проницаемость семенной оболочки также оказывают влияние на ПЗНК у злаковых культур [2].

К настоящему моменту установлено, что основной причиной ПЗНК является дисбаланс в соотношении двух процессов – покоя и прорастания [3]. В регуляции этих процессов задействованы разнообразные механизмы [4]. Наряду с другими факторами, исследователи связывают активность α -амилазы (ААА) с ПЗНК у злаковых культур [3]. В процессе прорастания зерна происходит гидролиз крахмала под действием α -амилазы [5]. Изоферменты α -амилазы контролируются семействами генов α -Amy1 и α -Amy2, расположенными на 6 и 7 хромосомах соответственно [6]. Пик активности α -Amy2 приходится на начальные стадии развития зерна, а активность α -Amy1 повышается при созревании зерна. Относительная экспрессия гена α -Amy1 была выше у сортов, неустойчивых к ПЗНК, по сравнению с устойчивыми сортами [6]. Изучение содержания и активности α -амилазы “позднего созревания” α -Amy1 является относительно новой областью исследований. Несвоевременный синтез α -амилазы приводит к уменьшению числа падения (ЧП) и ухудшению качества зерна [8]. Мука, полученная из такого зерна, имеет невысокую загущающую способность и считается непригодной для выпечки хлебобулочных изделий [9].

Для измерения ААА в зерне на настоящий момент применяются различные методы, в том числе колориметрический с использованием таблеток Фадебас, крахмально-йодометрический и анализ на приборах амилограф и миксолаб [10]. В последние годы очень часто используется метод Церальфа [10]. К преимуществам данного метода относятся использование микронавесок образца и применение 96-луночного спектрофотометра, что позволяет в короткие сроки провести анализ ААА у большого числа образцов.

Сокращения: ААА – α -амилазная активность, ИП – индекс прорастания, М/ВС – молочная/восковая спелость, ПЗНК – прорастание зерна на корню, ПС – полная спелость, ЧП – число падения.

Установлено, что устойчивость к ПЗНК является количественным признаком. У пшеницы устойчивость к ПЗНК контролируется несколькими локусами, которые расположены на 1A, 1B, 2A, 2B, 2D, 3A, 3B, 3D, 4A, 4B, 5B, 5D, 6A, 6B, 6D, 7A, 7B и 7D хромосомах [2]. К идентифицированным генам устойчивости к ПЗНК относятся гены *R*, контролирующие окраску [11]. У пшеницы *Tamyl10* является *R* геном, кодирующим активатор транскрипции флавоноидных пигментов. Краснозерные сорта пшеницы более устойчивы к ПЗНК, чем сорта с белым цветом зерна [12].

Оценку цвета зерна чаще проводят визуально, используя методику с применением раствора NaOH [13]. Однако это приводит к внешнему повреждению зерна. В настоящее время разработано приложение SeedCounter, позволяющее проводить точные измерения окраски без повреждения зерна [14, 15].

Как правило, оценку сортов на ПЗНК проводят в лабораторных условиях. Наиболее распространенным методом оценки устойчивости зерновых к ПЗНК является прямой провокационный способ, который позволяет определить индекс прорастания (ИП), процент прорастания и устойчивость к прорастанию [10, 16]. Оценка устойчивости к ПЗНК у пшеницы может проводиться на разных стадиях созревания зерна. Использование современных подходов может оптимизировать отбор зерновых культур, устойчивых к ПЗНК.

Цель работы – исследование эффективности различных подходов для оценки ПЗНК на стадиях молочно-восковой спелости и полного созревания зерна для отбора устойчивых сортов озимой мягкой пшеницы. Для достижения данной цели было проведено цифровое исследование окраски оболочки зерна, установлено разнообразие аллельных вариантов гена *Tamyl10*, определены ИП, число падения (ЧП) и проведен анализ ААА.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования и условия его выращивания. Объектом исследования являлась коллекция озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), предоставленная Федеральным исследовательским центром Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР). Данная коллекция состояла из 164 сортов пшеницы. Сорта имели следующие разновидности: albidum, lutescens, milturum, composituminumilturum, velutinum, graecum, ferrugineum, hostianum, erythrospermum, compositumferrugineum. Детально коллекция описана ранее [17].

К работе привлекался материал из изучаемой коллекции, репродуцированный в полевых условиях в Орловской области (131 краснозерный сорт, 7 белозерных сортов), и в искусственных условиях в Центре коллективного пользования “Лаборатория искусственного выращивания растений” (ЦКП ЛИВР) Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики (156 краснозерных сортов, 8 белозерных сортов).

Для исследований колосья собирали на двух стадиях созревания зерна: молочно-восковой спелости (М/ВС) и полного созревания (ПС) зерна. В первом случае сорта из коллекции высаживали делянками (1 м²) осенью 2021 г. в Орловской области (52°51' с. ш. 36°26' в. д.) и летом 2022 г. проводили сбор колосьев на стадии М/ВС зерна. Во втором случае образцы из коллекции, в количестве 5 шт. для каждого изучаемого сорта, после периода яровизации (2 мес. при 2°C) были высажены в ванны с керамзитом. Образцы выращивались в условиях гидропонной теплицы ЦКП ЛИВР при температуре 25–32°C при естественном освещении и при температуре 10–16°C при искусственном освещении (16 ч, средняя освещенность 22 кЛк) до ПС зерна. Стадию созревания зерна оценивали по плотности эндосперма.

Определение индекса прорастания зерна. Для определения ИП зерно из колосьев на стадии М/ВС сразу вымачивали вручную и стерилизовали. В случае, если колосья собирались на стадии ПС зерна, их перед вымачиванием помещали в электрический суховоздушный термостат ТС-1/80 (Смоленское СКТБ СПУ, Россия) на 3 дня при температуре 30°C, стерилизацию не проводили. Зерно каждого сорта в количестве 72 шт. заливали 30 мл 0.1% раствора перманганата калия на 20 мин с регулярным помешиванием. Далее зерно промывали проточной водой в течение 1 мин с использованием ситечка. В стеклянные чашки Петри помещали фильтровальную бумагу, добавляли 10 мл дистиллированной воды и раскладывали промытое зерно в 3-кратной повторности, из расчета 24 зерна на одну повторность. Далее чашки с зерном помещали в климатическую камеру С180-40 (Weiss Technik, Германия) без освещения на 7 дней при температуре 22°C и влажности 50%. Ежедневно фиксировали количество проросшего зерна, считая проросшим зерно, которое имело разрыв оболочки над зародышем. Для оценки жизнеспособности зерна по окончании эксперимента чашки с непроросшим зерном помещали в холодильник Atlant ХМ 4421-000 N (Atlant, Республика Беларусь) с температурой 5–6°C на 3 дня и далее оставляли при комнатных условиях (24°C) на 3 дня. Не-

проросшее зерно считали нежизнеспособным и в подсчете ИП не учитывали.

Подсчет ИП осуществлялся по формуле [18]:

$$\text{ИП} = \frac{7n_1 + 6n_2 + 5n_3 + 4n_4 + 3n_5 + 2n_6 + 1n_7}{DN}, (1)$$

где $n_1, n_2, \dots, n_7$ – число проросших зерен за первые, вторые и последующие сутки; N – общее число зерен; D – общее число дней испытания. Значение ИП варьирует в диапазоне от 0 до 1, где “0” – не проросло ни одно зерно, “1” – проросли все зерна.

Оценка активности α -амилазы. ААА оценивали с использованием набора реактивов методом Церальфа (Megazyme International Ireland Ltd, Ирландия) [19]. Для анализа ААА зерно из колосьев на стадии М/ВС сразу вымачивали вручную. Муку фракции меньше 0.5 мм получали с использованием кофемолки (Centek, КНР), 100 мг муки хранили при –80°C до момента проведения анализа. Если колосья собирали на стадии ПС зерна, то перед вымачиванием их помещали в термостат ТС-1/80 (Смоленское СКТБ СПУ, Россия) с температурой 30°C на 3 дня. После получения муки анализ проводили в тот же день. Экстракционный буфер (50 мМ $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_5$, 50 мМ NaCl , 2 мМ CaCl_2 , 0.005% NaN_3 , pH 5.4) комнатной температуры (22–24°C) в объеме 700 мкл добавляли к 100 мг муки. Экстракцию проводили в течение 20 мин с периодическим (5 раз) перемешиванием на Вортексе V-1 plus (BioSan, Латвия). После этого образцы центрифугировали (центрифуга MiniSpin, Eppendorf, Германия) при 3900 об./мин в течение 10 мин, отбирали супернатант. Дальнейший анализ проводили по процедуре, предложенной “Megazyme” для планшетных анализаторов. В ходе этой процедуры использовали коммерческий субстрат (блокированный п-нитрофенил-мальтогептаозид + избыточный уровень термостабильной α -глюкозидазы) в объеме 20 мкл. Через 20 мин после добавления 20 мкл экстракта к субстрату реакция останавливалась раствором ортофосфата натрия (pH 11) в объеме 300 мкл. Определение оптической плотности проводилось на планшетном анализаторе “Multiskan™ FC Microplate Photometer” (Thermo Fisher Scientific, Финляндия) при 405 нм. Одна единица церальфа (ЦЕ) определяется как количество фермента, необходимого для образования одного мкМ п-нитрофенола из блокированного п-нитрофенил-мальтогептаозида за 1 мин при условии наличия избытка термостабильной α -глюкозидазы. Для расчета применялась формула, предоставленная “Megazyme”:

$$\text{Единицы/г муки} = \frac{\Delta E}{\text{Время инкубации}} \times \frac{\text{Общий объем}}{\text{Объем субстрата}} \times \frac{l}{\epsilon_{\text{мм}}} \times \frac{\text{Объем буфера для экстракции}}{\text{Вес муки}}, \quad (2)$$

где ΔE — разность между оптической плотностью анализируемого образца и холостой пробой, представляющей собой смесь субстрата и раствора ортофосфата натрия, при длине волны 405 нм; время инкубации — время от момента внесения в лунку планшета экстракта и совместной инкубации с субстратом (мин); общий объем — суммарный объем образца перед измерением оптической плотности (мл); l — длина пути излучения в образце (см); $\epsilon_{\text{мм}}$ — коэффициент молярной экстинкции п-нитрофенола при 405 нм в 1% растворе ортофосфата натрия.

Определение окраски зерна. Фенотипирование зерна проводили на семенах из коллекции ВИР. Оценка выполнялась с использованием приложения SeedCounter, реализованного для персональных компьютеров и мобильных устройств (платформа Android) [14, 15]. С помощью данного приложения были обработаны изображения зерен, полученные с использованием цифрового фотоаппарата Canon EOS 600D (Canon, Япония), с объективом Canon EF 100 mm f/2.8 Macro USM. Для измерения и количественной оценки различия цвета оболочки зерна использовали значения “компонент цвета” в цветовой шкале Lab, полученные с использованием приложения SeedCounter. Данная цветовая шкала включает компоненту светлоты и две компоненты оттенка [11]. Первая из них, компонента **a** соответствует увеличению интенсивности красного цвета для положительных значений и зеленого для отрицательных. Вторая компонента — **b** соответствует увеличению интенсивности желтого цвета для положительных значений и синего для отрицательных. Мы характеризовали цвет зерен средними значениями этих двух компонент (Lab_ma и Lab_mb соответственно) для пикселей зерен на цифровых изображениях. Для простоты мы интерпретировали значения компоненты **a** как краснота, а значения компоненты **b** как желтизна.

Анализ числа падения. Оценка ЧП проводилась в соответствии с требованиями ГОСТ ISO 3093-2016 методом Хагберга-Пертена [20] на приборе ПЧП-7 (ООО “Биофизическая аппаратура”, Россия) после сбора зерна изучаемых сортов, выращенных в Орловской области в 2022 г.

Оценка аллельных вариаций гена *Tamyb10*. Анализ полиморфизма гена был проведен на растительном материале, который был собран с тепличных растений. Геномную ДНК выделяли из листьев молодых растений по методике, описанной ранее [21]. Буфер для выделения ДНК содержал 0.1 M Tris, 0.5 M NaCl, 0.05 M

EDTA, 0.38% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 1.25% SDS. В данной работе были использованы ПЦР-маркеры, разработанные Ними с соавт. [22]. Для выявления аллельных вариантов *Tamyb10-A1* использовали комбинации праймеров Tamyb10-LP6 (5'-ctatgtggatggccttgat-3')/Tamyb10-RP6 (5'-ctacagctcgtttgggaag-3'); Tamyb10-LP7 (5'-tttcaatcgagtgggcataa-3')/Tamyb10-RP4 (5'-cctgacgatgagctcctctt-3'); для выявления аллельных вариантов *Tamyb10-B1* — Tamyb10-LP2 (5'-agcaagaggaacctgcagtc-3')/Tamyb10-RP1 (5'-gatgcctccagatcaagg-3'); *Tamyb10-D1* — Tamyb10-LP9 (5'-taggccaacaccttctaaacg-3')/Tamyb10-RP3 (5'-aggcacaccagctatttgg-3') [14]. Реакцию ПЦР проводили с использованием Tag ДНК-полимеразы и готовой реакционной смеси БиоМастер HS-Taq ПЦР-Спец (2×) (Биолабмикс, Россия). Протокол проведения амплификации [22] был модифицирован и состоял из следующих этапов: предварительной денатурации ДНК при 94°C (5 мин) — однократно; денатурации ДНК при 94°C (30 с); отжига праймеров при 61°C (30 с) для *Tamyb10-A*, 55°C (30 с) для *Tamyb10-B1*, при 64°C (30 с) для *Tamyb10-D1*; элонгации при 72°C (2 мин) для *Tamyb10-A1*, 72°C (30 с) для *Tamyb10-B1*, 72°C (1 мин) для *Tamyb10-D1* (30 циклов). Финальный этап пролонгирования нуклеотидной цепи — 7 мин при 72°C (однократно). ПЦР выполняли на амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Электрофоретический анализ продуктов амплификации проводили с использованием камеры Sub Cell model 192 (Bio-Rad, США) в 1.5% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Результат визуализировали и документировали с помощью системы гель-документирования Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США).

Статистический анализ. Статистическую обработку проводили с использованием программы STATISTICA 12 и MS Excel 2010. Для построения графиков использовали пакеты R “ggbreak”, “ggplot2”, “ggpubr” [23]. На диаграммах “ящик с усами” представлены медианы и 25–75-й проценти в прямоугольниках и диапазон невыпадающих значений. Достоверность отличий оценивали по U-критерию Манна-Уитни и критерию Крускала-Уоллиса. Корреляционную связь оценивали, используя коэффициент корреляции Спирмана. Для того, чтобы привести данные ИП и ААА на обеих стадиях созревания к нормальному распределению, использовали преобразование Бокса-Кокса (пакет R EnvStats). Оптимальный параметр λ для ИП ПС составлял 1, для ИП М/ВС этот параметр был равен –4. Для ААА на обеих стадиях созревания зерна значение λ составляло –1.

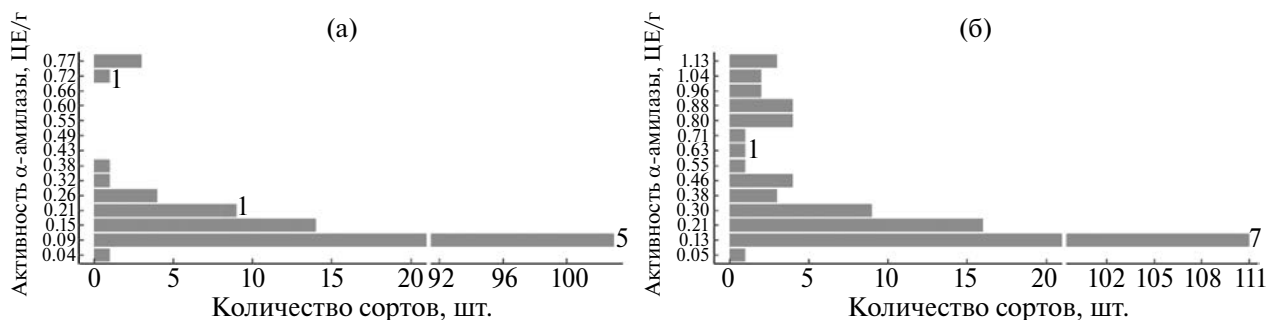


Рис. 2. Распределение значений активности α -амилазы у краснозерных и белозерных сортов озимой мягкой пшеницы: а – стадия молочной/восковой спелости; б – стадия полного созревания зерна. Цифры напротив столбцов указывают на число белозерных сортов.

Проведено сравнение данных ААА, полученных методом Церальфа, на стадиях М/ВС и ПС, и по оценке ЧП после сбора зерна. Показано, что данные по ААА, определяемые разными методами на разных этапах созревания и независимо от места выращивания, коррелировали между собой. Так, невысокая положительная корреляция отмечалась между оценкой ААА, полученной методом Церальфа, на стадии М/ВС и ПС ($r = 0.32$, $P \leq 0.001$). Невысокая отрицательная корреляция наблюдается между ЧП и ААА на стадии М/ВС и ПС, ($r = -0.43$, $P \leq 0.001$) и ($r = -0.22$, $P \leq 0.05$) соответственно (Дополнительные материалы, рис 1). Большой уровень отрицательной корреляции ($r = -0.43$, $P \leq 0.001$) между ААА, полученной методом Церальфа, на стадии М/ВС и ЧП, видимо, связан с тем, что оценка зерна проводилась с растений, которые были выращены в одинаковых условиях.

Корреляционный анализ был также проведен для выявления взаимосвязи между ИП на разных стадиях созревания зерна и ЧП при оценке коллекции пшеницы на предмет устойчивости/восприимчивости к прорастанию зерна. Была выявлена невысокая отрицательная корреляция ($r = -0.36$, $P \leq 0.001$) между ИП на М/ВС зерна и ЧП (Дополнительные материалы, рис 1).

В целом, сравнение краснозерных сортов по всем трем параметрам (табл. 1, Дополнительные материалы) позволило выделить группу сортов наиболее устойчивых к ПЗНК, в которую вошли 73 краснозерных сорта озимой мягкой пшеницы из 156 изученных. Белозерных сортов, устойчивых к прорастанию, выявлено не было.

Анализ окраски зерна. Краснозерные сорта пшеницы хотя и являются более устойчивыми к прорастанию зерна на корню, чем белозерные, также различались между собой по данному признаку. Нами была предпринята попытка разделить группу краснозерных сортов пшеницы по степени выраженности окраски, используя подходы цифрового фенотипирования, как описано в разделе “Материалы и методы”.

На рис. 4 представлено распределение сортов пшеницы по стандартизованным значениям “компонент цвета а и b”. Коллекция была разделена на 3 типа окраски зерна относительно значений по указанным компонентам. К нулевому типу с диапазоном значений по красноте и желтизне $Lab_ma < 0$ и $Lab_mb > 0$ были отнесены 23 сорта, в том числе все белозерные. На рис. 4 белозерные сорта обведены овалами. Первый тип включал 52 сорта, значения компонент попадали в диапазон $Lab_ma < 0$ и

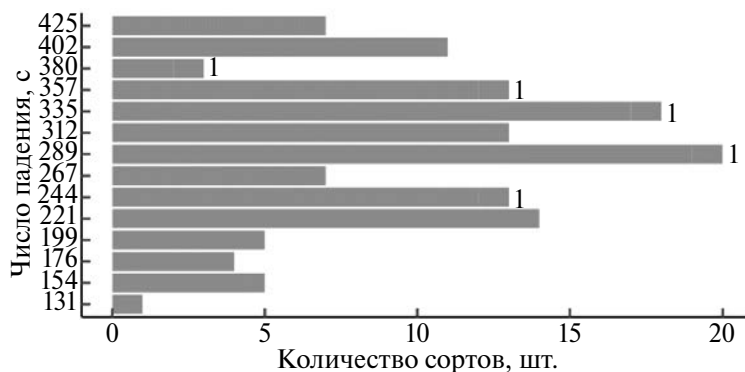


Рис. 3. Распределение значений числа падения у краснозерных и белозерных сортов озимой мягкой пшеницы. Цифры напротив столбцов указывают на число белозерных сортов.

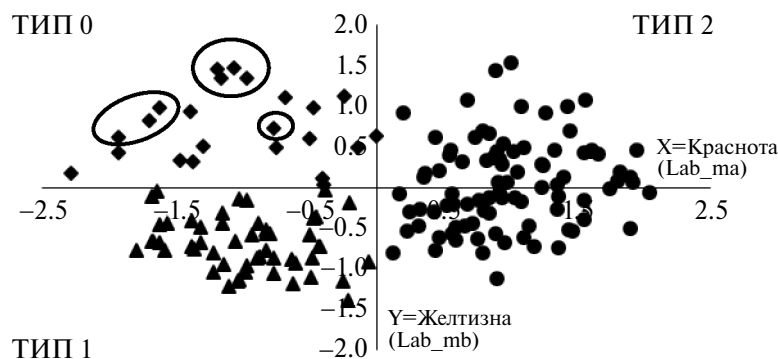


Рис. 4. Диаграмма рассеяния в пространстве средних значений компонент **a** и **b** цветовой модели Lab на цифровых изображениях для зерен сортов озимой мягкой пшеницы. Ось абсцисс – среднее значение компоненты **a** (Lab_ma, краснота); ось ординат – среднее значение компоненты **b** (Lab_mb, желтизна). Обозначения маркера: ромб – 0 тип окраски; треугольник – 1 тип окраски; круг – 2 тип окраски. Овалами обведены белозерные сорта.

Lab_mb < 0. Наибольшее количество сортов – 89 – относилось ко второму типу окраски зерна, с диапазоном значений компонент по Lab_ma > 0. Lab_mb имел как положительные, так и отрицательные значения.

Оценка корреляции диапазона значений Lab_ma и Lab_mb со значениями ИП или ЧП для красnozерных сортов не выявила взаимосвязи между цифровыми показателями цвета с показателями, используемыми для оценки прорастания зерна на корню.

Помимо цифровой оценки окраски проведено изучение распределения аллельных вариантов генов *Tamyb10*, которые являются наиболее вероятными кандидатами для генов R-1, контролирующих красную окраску зерна [22]. В пшенице данные гены представлены в трех субгеномах – *Tamyb10-A1*, *Tamyb10-B1* и *Tamyb10-D1* и локализованы на хромосомах 3AL, 3BL и 3DL соответственно [22]. Доминантный аллель генов **b** определяет красную окраску зерна. Рецессивный **a** аллель, представленный в трех субгеномах пшеницы, характерен для белозерных сортов [26]. В данной работе проведен анализ аллельного состава гена *Tamyb10* в коллекции озимой пшеницы с использованием специфических праймеров и определено количество рецессивных **a** аллелей гена. У 164 изученных сортов озимой мягкой пшеницы было выявлено восемь аллельных вариантов гена *Tamyb10* в трех субгеномах (табл. 2). Мак-

симальное количество сортов – 77 имело не менее двух доминантных аллелей *Tamyb10-B1b*, *Tamyb10-D1b*. Как и ожидалось, все белозерные сорта имели три рецессивных аллеля гена *Tamyb10*.

Для обнаружения различий в прорастающей способности зерна у сортов пшеницы, различающихся по аллельным вариантам гена *Tamyb10*, был проанализирован ИП на стадии М/ВС зерна. Для этого восемь аллельных вариантов были объединены в 3 группы по числу доминантных аллелей гена *Tamyb10*. В первую группу вошли красnozерные сорта, имеющие два и более доминантных генов окраски. Во вторую группу вошли красnozерные сорта, имеющие один доминантный ген, третью – белозерные сорта, не имеющие доминантных генов окраски. Достоверные различия по ИП обнаружены только при сравнении групп с доминантными генами (1, 2 группа) и группы с белозерными сортами пшеницы (3 группа) (рис. 5). Чтобы оценить, связаны ли эти различия с окраской оболочки зерна пшеницы, проанализировали данные по двум ранее изученным показателям – Lab_ma и Lab_mb (рис. 4). Выявлено, что наблюдаются аналогичные различия двух первых групп с третьей группой, имеющей только рецессивные (**a**) аллели гена *Tamyb10* (рис. 2а, б, Дополнительные материалы).

Таким образом, анализ цифровой оценки окраски зерна и аллельного состава генов

Таблица 2. Количество сортов озимой мягкой пшеницы, содержащих различные сочетания аллельных вариантов генов *Tamyb10-A1*, *Tamyb10-B1*, *Tamyb10-D1*

Аллельные варианты <i>Tamyb10-A1</i> / <i>Tamyb10-B1</i> / <i>Tamyb10-D1</i>							
<i>a</i> / <i>b</i> / <i>b</i>	<i>a</i> / <i>b</i> / <i>b</i>	<i>a</i> / <i>b</i> / <i>b</i>	<i>a</i> / <i>b</i> / <i>b</i>	<i>a</i> / <i>b</i> / <i>b</i>	<i>a</i> / <i>b</i> / <i>b</i>	<i>a</i> / <i>b</i> / <i>b</i>	<i>a</i> / <i>b</i> / <i>b</i>
55	22	36	19	10	8	6	8

Примечание: *a* – рецессивный аллель; *b* – доминантный аллель; * – аллель не определяется как *a* или *b*.

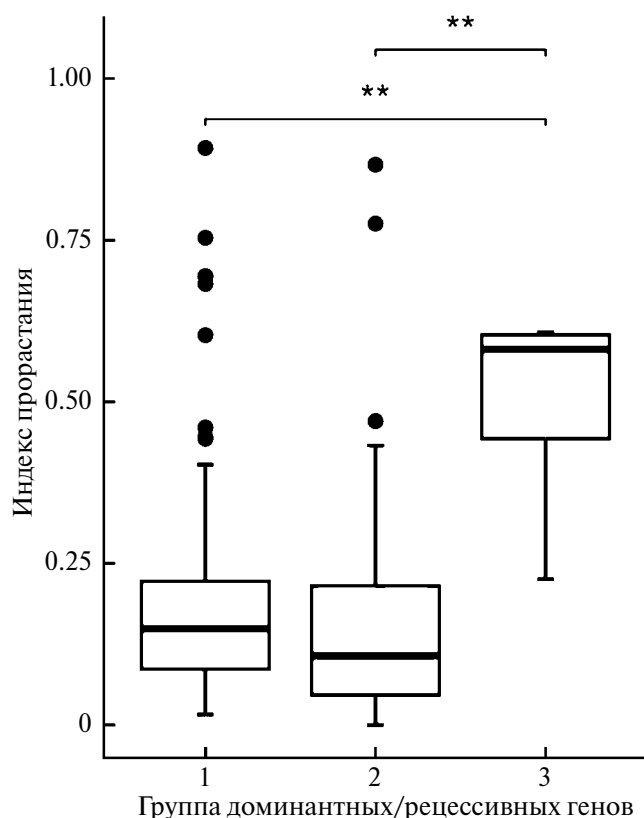


Рис. 5. Диаграмма “ящик с усами” распределения индекса прорастания на молочной/восковой стадии созревания зерна для сортов озимой мягкой пшеницы, содержащих различные сочетания аллельных вариантов генов *Tamylb10-A1*, *Tamylb10-B1*, *Tamylb10-D1*: 1 группа — два или более доминантных гена, краснозерные сорта пшеницы; 2 группа — один доминантный ген, краснозерные сорта пшеницы; 3 группа — нет доминантных генов, белозерные сорта пшеницы. На графике представлены медиана и 25—75 процентиля в прямоугольниках и диапазон невыпадающих значений. Черными точками на графике отмечены выбросы. Звездочками “***” отмечены достоверные различия при $P \leq 0.01$, использовали U-критерий Манна-Уитни.

Tamylb10 не выявил критерия, который можно было бы использовать дополнительно к ИП и ЧП для разделения краснозерных сортов пшеницы по устойчивости к ПЗНК.

Изучение коллекции озимой мягкой пшеницы на предмет устойчивости к ПЗНК выявило отрицательную корреляционную связь между ИП и ЧП, а также между ААА и ЧП. Таким образом, увеличение ИП приводило к снижению ЧП за счет увеличения ААА, однако положительной корреляции между показателем ИП и ААА обнаружено не было, что свидетельствует о наличии дополнительных процессов, происходящих при прорастании зерна, не изученных в данной работе.

ОБСУЖДЕНИЕ

Прорастание зерна до сбора урожая наносит колоссальный экономический ущерб. К настоящему моменту проведены исследования, которые позволяют прояснить процессы и механизмы запуска и передачи сигнала, а также внешние условия, приводящие к прорастанию зерна на материнском растении [27]. Однако до сих пор остаются неясными многие моменты [1]. Выбор объекта в данной работе обоснован тем, что пшеница является одной из важных злаковых культур, которая широко выращивается почти на всех континентах. Для 2.5 млрд человек, проживающих примерно в 90 странах, она является основным продуктом питания [13]. При изучении злаковых культур на предмет устойчивости к ПЗНК используют комплексный подход, применяя различные методики [10]. Немаловажным является также выбор стадии созревания зерна для изучения устойчивости сортов к данному процессу. Так, в недавнем исследовании Mares и Himi [28] оценку ИП у зерен пшеницы проводили с 20 по 120 день после антезиса. В нашей работе изучение проводили на следующих стадиях созревания зерна: М/ВС и ПС зерна. Определение ИП у сортов, зерно которых хранилось при комнатной температуре в течение 3 мес. показало, что ИП был одинаковым (~1) у сортов всей изученной коллекции (данные не представлены). Nyachiro с соавт. [29] в своей работе рекомендуют после вымолачивания хранить зерно при -20°C до момента проведения эксперимента, это позволяло уменьшить процент выхода зерна из покоя. Поскольку различия в ИП у краснозерных сортов наблюдались на разных стадиях созревания зерна (табл. 1), мы полагаем, что оценку ИП на стадии М/ВС зерна можно использовать для отбора краснозерных сортов, наиболее устойчивых к ПЗНК. Следует отметить, что на стадии молочной спелости зерновки проявляли большую чувствительность к погодным условиям [30].

Поскольку в процессе прорастания зерна крахмал подвергается гидролизу α -амилазами, в подобных исследованиях наряду с провокационным методом применяют подходы по оценке амилазной активности [2]. Определение ЧП является не только классическим способом для отражения уровня ААА, но также является международным стандартом качества зерна. По показателю ЧП выделяют три группы: низкое ЧП (ниже 150–200 с), среднее (200–350 с) и высокое (выше 350 с) [16]. У большинства сортов пшеницы было детектировано среднее ЧП (рис. 3), при этом минимальное значение ЧП составляло 131 с, а максимальное — 425 с. Корреляционная связь между показателями ЧП и ИП была невысокой ($r = -0.36$), однако в работе Rasul с соавт. [31] отмечена более сильная корреляционная связь между ЧП и ИП у яровой пшеницы ($r = -0.86$).

Анализ распределения значений ААА среди сортов показал, что наблюдается незначительное повышение уровня активности данного фермента по мере созревания зерна (рис. 2). В работе Yu с соавт. [32] показаны различия в уровне ААА при наступлении физиологической зрелости зерна и за 3 дня до этого момента. Авторы обнаружили снижение ААА в момент физиологической зрелости зерна [32], при этом не было различий в уровне ААА у белозерных и краснозерных сортов. Simsek с соавт. [33] показали разный уровень ААА у проросшего и непроросшего зерна. Известно, что в зерне пшеницы присутствуют несколько изоформ α -амилаз [5]. Активность одной из изоформ, α -амилазы позднего созревания, повышается через 30 дней после начала цветения [34]. Мы предположили, что наблюдаемое незначительное повышение уровня ААА после стадии М/ВС зерна (рис. 2) связано именно с этой изоформой.

Анализ корреляционной связи между показателями ЧП и ААА показал наличие отрицательной корреляции ($r = -0.43$, $P < 0.001$), что согласуется с литературными данными [35].

В данной работе с использованием специфичных ПЦР-маркеров к аллельным вариантам гена *Tamylb10* было показано, что наиболее многочисленная группа из изученных сортов имеет от двух и более доминантных генов, контролирующих красную окраску зерна (табл. 2). Однако различия по ИП между сортами, различающихся по числу доминантных генов, выявлено не было (рис. 5). Следует отметить, что в некоторых работах различия между генотипами с рецессивными и доминантными аллелями гена *Tamylb10* по ИП имели другую закономерность. Так, в работах Wang с соавт. [26] генотипы с аллельной комбинацией рецессивных аллелей “*aaa*” показывали более низкий ИП (0.264), чем генотипы с аллельной комбинацией из доминантных и рецессивных аллелей “*bba*” (ИП = 0.519).

В нашей работе было установлено, что генотипы с тремя рецессивными *a* аллелями (белозерные сорта) имели достоверную разницу по красноте (Lab_ma) и желтизне (Lab_mb) (рис 2а, б, Дополнительные материалы), по сравнению с краснозерными генотипами, имеющими доминантные *b* аллели. Однако различий между группами краснозерных сортов, различающихся по числу доминантных *b* аллелей по красноте (Lab_ma) и желтизне (Lab_mb) выявлено не было. Это дает основание полагать, что только по оценке цветовой интенсивности окраски зерна невозможно выявить различия в устойчивости к ПЗНК у краснозерных сортов озимой мягкой пшеницы. По всей видимости, у краснозерных сортов существуют другие, отличные от *Tamylb10* гены, участвующие в формировании устойчивости к ПЗНК. Необходимо использовать подходы

для поиска молекулярно-генетических маркеров устойчивости к ПЗНК.

Оценка ИП, ААА на М/ВС и ЧП позволила выделить ряд краснозерных сортов изучаемой коллекции, которые имеют максимальную устойчивость к ПЗНК. Минимальные значения ИП и ААА и, напротив, максимальные значения ЧП имели следующие сорта: –/К-4832, Плюсская, Местная, Омская озимая, Безенчукская 380, Казанская 560, Московская 39, Nutka, Немчиновская 17 и Torrild. К наименее устойчивым краснозерным сортам были отнесены следующие: Велижанская, ТАМ 200, Казанская 285, Yasen, Ariesan, Силуэт, Статус, Ермак, Калач 60, Лидия. Наши данные согласуются с результатами других исследователей, полученными для отдельных сортов по ИП и/или ЧП. Так, в краснозерную группу сортов, наиболее устойчивых к ПЗНК, включены сорта Московская 39 и Безенчукская 380, а сорта ТАМ 200, Ермак и Калач 60 отнесены к наименее устойчивым сортам по изучаемому признаку (табл. 1, Дополнительные материалы) [36–40]. Кроме того, потребуются дальнейшее изучение причины различий в показателях ИП среди краснозерных сортов озимой мягкой пшеницы.

Таким образом, оценив коллекцию озимой мягкой пшеницы на устойчивость к прорастанию зерна на корню, было показано, что оптимально проводить оценку индекса прорастания на молочной/восковой стадии созревания зерна. Следует отметить, что корреляции между количеством доминантных аллелей и степенью окраски зерна (цифровая оценка) и индексом прорастания у краснозерных сортов пшеницы выявлено не было. Обнаружена невысокая отрицательная корреляция между числом падения и индексом прорастания на молочной/восковой стадии. Показано, что данные по активности α -амилазы, определяемые разными методами на разных стадиях созревания зерна и независимо от места выращивания, коррелируют между собой.

Выращивание растений проводили в Центре коллективного пользования “Лаборатория искусственного выращивания растений” Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, который поддерживается бюджетным проектом № FWNR-2022-0017.

Финансирование исследования осуществлялось Российским научным фондом, проект № 21-76-30003.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tai L., Wang H.J., Xu X.J., Sun W.H., Ju L., Liu W.T., Li W.Q., Sun J., Chen K.M. Pre-harvest sprouting in cereals: genetic and biochemical mechanisms // J. Exp. Bot. 2021. V. 72. P. 2857.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erab024>
2. Ali A., Cao J., Jiang H., Chang C., Zhang H.P., Sheikh S.W., Shah L., Ma C. Unraveling molecular and genetic studies of wheat (*Triticum aestivum* L.) resistance against factors causing pre-harvest sprouting // Agronomy. 2019. V. 9. P. 117.
<https://doi.org/10.3390/agronomy9030117>
3. Sohn S.I., Pandian S., Kumar T.S., Zoclan-clounon Y.A.B., Muthuramalingam P., Shilpha J., Satish L., Ramesh M. Seed dormancy and pre-harvest sprouting in rice – an updated overview // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. 11804.
<https://doi.org/10.3390/ijms222111804>
4. Kashiwakura Y., Kobayashi D., Jikumaru Y., Takebayashi Y., Nambara E., Seo M., Kamiya Y., Kushi-ro T., Kawakami N. Highly sprouting-tolerant wheat grain exhibits extreme dormancy and cold imbibition-resistant accumulation of abscisic acid // Plant Cell Physiol. 2016. V. 57. P. 715.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcw051>
5. Mieog C.J., Janeczek S., Ral J.P. New insight in cereal starch degradation: identification and structural characterization of four α -amylases in bread wheat // Amylase. 2017. V. 1. P. 35.
<https://doi.org/10.1515/amylase-2017-0004>
6. Laethauwer S.D., Riek J.D., Stals I., Reheul D., Haesaert G. α -Amylase gene expression during kernel development in relation to pre-harvest sprouting in wheat and triticale // Acta Physiol. Plant. 2013. V. 35. P. 2927.
<https://doi.org/10.1007/s11738-013-1323-9>
7. Vetch J.M., Stougaard R.N., Martin J.M., Giroux M.J. Review: revealing the genetic mechanisms of pre-harvest sprouting in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) // Plant Sci. 2019. V. 281. P. 180.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.01.004>
8. Mares D.J., Mrva K. Wheat grain preharvest sprouting and late maturity alpha-amylase // Planta. 2014. V. 240. P. 1167.
<https://doi.org/10.1007/s00425-014-2172-5>
9. Kottearachchi N.S., Uchino N., Kato K., Miura H. Increased grain dormancy in white-grained wheat by introgression of preharvest sprouting tolerance QTLs // Euphytica. 2006. V. 152. P. 421.
<https://doi.org/10.1007/s10681-006-9231-3>
10. Федяева А.В., Салина Е.А., Шумный В.К. Факторы, влияющие на прорастание зерна на корню у мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), и методы их оценки // Генетика. 2023. Т. 59. С. 5.
<https://doi.org/10.31857/S0016675823010058>
11. Хлесткина Е.К. Гены, детерминирующие окраску различных органов пшеницы // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012. Т. 16. С. 202.
12. Groos C., Gay G., Perretant M.R., Gervais L., Bernard M., Dedryver F., Charmet G. Study of the relationship between pre-harvest sprouting and grain color by quantitative trait loci analysis in a whitexred grain bread-wheat cross // Theor. Appl. Genet. 2002. V. 104. P. 39.
<https://doi.org/10.1007/s001220200004>
13. Kumar M., Kumar S., Sandhu K.S., Kumar N., Saripalli G., Prakash R., Nambardar A., Sharma H., Gautam T., Balyan H.S., Gupta P.K. GWAS and genomic prediction for pre-harvest sprouting tolerance involving sprouting score and two other related traits in spring wheat // Mol. Breed. 2023. V. 43. P. 14.
<https://doi.org/10.1007/s11032-023-01357-5>
14. Komyshev E., Genaev M., Afonnikov D. Evaluation of the SeedCounter, a mobile application for grain phenotyping // Front. Plant Sci. 2017. V. 7. P. 1990.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01990>
15. Afonnikov D.A., Komyshev E.G., Efimov V.M., Genaev M.A., Koval V.S., Gierke P.U., Börner A. Relationship between the characteristics of bread wheat grains, storage time and germination // Plants. 2022. V. 11. P. 35.
<https://doi.org/10.3390/plants11010035>
16. Крупнов В.А., Крупнова О.В. Подходы по улучшению качества зерна пшеницы: селекция на число падения // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015. V. 19. P. 604.
<https://doi.org/10.18699/VJ15.07>
17. Shcherban A.B., Kuvaeva D.D., Mitrofanova O.P., Khverenets S.E., Pryanishnikov A.I., Salina E.A. Targeting the B1 gene and analysis of its polymorphism associated with awned/awnless trait in Russian germplasm collections of common wheat // Plants. 2021. V. 10. P. 2285.
<https://doi.org/10.3390/plants10112285>
18. Walker-Simmons M. Enhancement of ABA responsiveness in wheat embryos by high temperature // Plant Cell Environ. 1988. V. 11. P. 769.
19. McCleary B.V., McNally M., Monaghan D., Mugford D.C. Measurement of α -amylase activity in white wheat flour, milled malt, and microbial enzyme preparations, using the Ceralpha assay: collaborative study // J. AOAC Int. 2002. V. 85. P. 1096.
20. Бундина О.И., Герасина А.Ю. Введение новых межгосударственных стандартов на зерно, продукты его переработки и методы определения качества // Инновационные технологии производства и хранения материальных ценностей для государственных нужд. 2019. С. 63.
21. Сколотнева Е.С., Леонова И.Н., Букатич Е.Ю., Салина Е.А. Методические подходы к идентификации эффективных генов, определяющих устойчивость пшеницы к комплексу грибных заболеваний // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. Т. 21. С. 862.
<https://doi.org/10.18699/VJ17.307>
22. Himi E., Maekawa M., Miura H., Noda K. Development of PCR markers for Tamyb10 related to R-1, red

- grain color gene in wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2011. V. 122. P. 1561.
<https://doi.org/10.1007/s00122-011-1555-2>
23. Xu S., Chen M., Feng T., Zhan L., Zhou L., Yu G. Use ggbreak to effectively utilize plotting space to deal with large datasets and outliers // *Front. Genet.* 2021. V. 12. P. 774846.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2021.774846>
24. Derkx A.P., Mares D.J. Late-maturity α -amylase expression in wheat is influenced by genotype, temperature and stage of grain development // *Planta.* 2020. V. 251. P. 51.
<https://doi.org/10.1007/s00425-020-03341-1>
25. Эрпера В.Э. Эталоник – автоматическая система определения истинного значения числа падения // *Хлебопродукты.* 2018. № 10. С. 20.
26. Wang Y., Wang X.L., Meng J.Y., Zhang Y.J., He Z.H., Yang Y. Characterization of Tamyb10 allelic variants and development of STS marker for pre-harvest sprouting resistance in Chinese bread wheat // *Mol. Breed.* 2016. V. 36. P. 148.
<https://doi.org/10.1007/s11032-016-0573-9>
27. Gao X., Hu C.H., Li H.Z. Yao Y.J., Meng M., Dong J., Zhao W.C., Chen Q.J., Li X.Y. Factors affecting pre-harvest sprouting resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.): a review // *J. Anim. Plant Sci.* 2013. V. 23. P. 556.
28. Mares D., Himi E. The role of TaMYB10-A1 of wheat (*Triticum aestivum* L.) in determining grain coat colour and dormancy phenotype // *Euphytica.* 2021. V. 217. P. 89.
<https://doi.org/10.1007/s10681-021-02826-8>
29. Nyachiro J.M., Clarke F.R., DePauw R.M., Knox R.E., Armstrong K.C. Temperature effects on seed germination and expression of seed dormancy in wheat // *Euphytica.* 2002. V. 126. P. 123.
30. Fišerová H., Hartman I., Prokeš J. The effect of weather and the term of malting on malt quality // *Plant Soil Environ.* 2015. V. 61. P. 393.
<https://doi.org/10.17221/174/2015-PSE>
31. Rasul G., Humphreys G.D., Wu J., Brule-Babel A., Fofana B., Glover K.D. Evaluation of preharvest sprouting traits in a collection of spring wheat germplasm using genotype and genotype × environment interaction model // *Plant Breed.* 2012. V. 131. P. 244.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2011.01931.x>
32. Yu N., Laurenz R., Siler L., Ng P.K.W., Souza E., Lewis J.M. Evaluation of α -amylase activity and falling number around maturity for soft white and soft red wheat varieties in Michigan // *Cereal Res. Commun.* 2015. V. 43. P. 672.
<https://doi.org/10.1556/0806.43.2015.026>
33. Simsek S., Ohm J.B., Lu H., Rugg M., Berzonsky W., Alamri M.S., Mergoum M. Effect of pre-harvest sprouting on physicochemical properties of starch in wheat // *Foods.* 2014. V. 3. P. 194.
<https://doi.org/10.3390/foods3020194>
34. Kondhare K.R., Farrell A.D., Kettlewell P.S., Hedden P., Monaghan J.M. Pre-maturity α -amylase in wheat: the role of abscisic acid and gibberellins // *J. Cereal Sci.* 2015. V. 63. P. 95.
<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.03.004>
35. Kiszonas A.M., Engle D.A., Pierantoni L.A., Morris C.F. Relationships between falling number, alpha-amylase activity, milling, cookie, and sponge cake quality of soft white wheat // *Cereal Chem.* 2018. V. 95. P. 373.
<https://doi.org/10.1002/cche.10041>
36. Кузьмич М.А., Сандухадзе Б.И., Мамедов Р.З., Давыдова Н.В., Кузьмич Л.С. Устойчивость к прорастанию в колосе зерновых культур селекции ФИЦ “Немчиновка” // *Инновационные технологии производства и хранения материальных ценностей для государственных нужд* / Под ред. Ю.И. Никитченко, К.Б. Гурьева, С.Л. Белецкого, Т.Б. Гусева, Д.Ю. Пономарева, А.Н. Рогова. Москва: Галлея-Принт, 2019. С. 93.
37. Сухоруков А.Ф., Сухоруков А.А., Шаболкина Е.Н., Пронович Л.В. Селекционное улучшение озимой пшеницы по признаку “число падения” // *Зерновое хозяйство России.* 2017. С. 40.
38. Оразаева И.В. Оценка сортов озимой мягкой пшеницы различных экотипов в условиях Юго-Западной части ЦЧР // *Инновации в АПК: проблемы и перспективы.* 2018. С. 135.
39. Крупнова О.В., Свистунов Ю.С. Устойчивость к предуборочному прорастанию и число падения у озимой мягкой пшеницы в Поволжье // *Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук.* 2014. № 5. С. 3.
40. Wu J.M., Carver B.F. Sprout damage and preharvest sprout resistance in hard white winter wheat // *Crop Sci.* 1999. V. 39. P. 441.

УДК 581.1

МЕТАБОЛИЗМ КАЛЛОЗЫ В ВОЛОКНАХ ЛЬНА ПРИ ГРАВИОТВЕТЕ: АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ¹

© 2024 г. Н. Н. Ибрагимова^{а, *}, Н. Е. Мокшина^а

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

*e-mail: nibra@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.11.2023 г.

После доработки 23.11.2023 г.

Принята к публикации 23.11.2023 г.

Двигательные реакции растений, относящиеся к тропизмам, обычно осуществляются с использованием механизмов роста растяжением. Однако в данном исследовании изучался гравитропизм на уровне клеток (первичные флоэмные волокна), закончивших свой рост и формирующих утолщенную третичную клеточную стенку. Проведены инвентаризация и анализ экспрессии генов ферментов, ответственных за метаболизм каллозы, на разных стадиях развития флоэмных волокон льна (*Linum usitatissimum* L.) и при гравитропизме. Выявлены гены предполагаемых β -1,3-глюкансинтаз (GSLs) и β -1,3-глюканаз (BGs), имеющие дифференциальный характер экспрессии в исследуемых клетках, среди которых отмечены гены с максимальным уровнем экспрессии на определенной стадии развития. В основном при гравитропизме экспрессия генов β -1,3-глюкансинтаз была понижена, тогда как для генов β -1,3-глюканаз были характерны различные профили экспрессии, среди которых выявлены гены с повышенным уровнем экспрессии только при гравитропизме (*LusBG1* и *LusBG3*). Полученные данные позволили предположить наличие активного метаболизма каллозы в клеточной стенке исследуемых волокон на разных стадиях развития и доминирование деградации каллозы в ходе гравитропизма. Результаты работы закладывают основу для дальнейших исследований функции каллозы в развитии волокон и реализации двигательной реакции растений.

Ключевые слова: гравитропизм, волокно, третичная клеточная стенка, каллоза, β -1,3-глюкансинтазы (каллозосинтазы), β -1,3-глюканазы, экспрессия генов

DOI: 10.31857/S0015330324020086, EDN: OAXKXV

ВВЕДЕНИЕ

Гравитропизм рассматривают как способность различных органов растения располагаться и расти в определенном направлении относительно вектора гравитации. Такое движение для растений играет ключевую роль в их раз-

витии и акклиматизации к окружающей среде. Среди ключевых вопросов — понимание механизмов двигательной реакции. На клеточном уровне растения имеют два основных двигателя. Первый, осмо-гидравлический, реализуется в клетках с первичными клеточными стенками; второй “работает” за счет набухания/сжатия полимеров утолщенных вторичных клеточных стенок, которые формируются в клетках реакционной древесины [1]. Исследованиям этих двигателей посвящены сотни работ, однако многие вопросы остаются открытыми [1, 2]. Считают, что в механизмах второго двигателя задействованы желатинозные волокна растений, широко распространенные в разных органах многих таксонов. Они имеют особый состав и архитектуру клеточной стенки (КС), которая называется либо G-слоем вторичной клеточной стенки, либо третичной клеточной стенкой (ТКС) [2]. Сообщалось, что желатинозные волокна ксилемы ответственны за восстановление вертикального

¹ Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: 10.31857/S0015330324020086

Сокращения: КС — клеточная стенка; ТКС — третичная клеточная стенка; BG — β -1,3-глюканаза; CBM — углевод-связывающий модуль; CTS — С-терминальная гидрофобная последовательность; GH17 — семейство гликозидгидролаз 17; GPI — гликозилфосфатидилинозитол; GSL — β -1,3-глюкансинтаза; iFIBa — интрузивно растущие волокна; OPP — противоположная PUL-стороне (нижняя сторона стебля при подъеме растения); PF — (PFAM) — семейство белковых доменов; PR — pathogenesis-related, связанный с патогенозом; PUL — pulling side (тянущая сторона; верхняя сторона стебля при подъеме растения); tFIBa — ранняя стадия формирования третичной клеточной стенки; tFIBb — поздняя стадия формирования третичной клеточной стенки; TGR — total gene reads, число полных прочтений генов.

положения деревьев в ходе отрицательной гравитропической реакции [3, 4] и сокращение органов, наблюдаемое в корнях и гипокотильях [5, 6]. Первичные флоэмные волокна льна по своим характеристикам относят тоже к желатинозным. Выдвинутые предположения о проявлении контрактивных свойств у волокон при гравииответе дало основание называть их “мускулами” растений [2, 7]. В таких волокнах в ходе гравитропического ответа была обнаружена каллоза [7]. Отложение каллозы показано и в трахеидах древесины сжатия, когда растениям приходилось восстанавливать вертикальное положение [4, 8].

Известно, что отложение каллозы, аморфного β -1,3-глюкана с некоторыми β -1,6 ответвлениями [9], строго контролируется во времени и пространстве. В местах ее отложения изменяются физические и механические свойства КС: повышается жесткость при сохранении гибкости и снижается проницаемость [10]. Эти изменения имеют фундаментальное значение для правильного выполнения многочисленных процессов, таких как деление клеток, развитие мужских гаметофитов, межклеточный транспорт или реакция на биотические и абиотические стрессовые факторы [10]. Локальные отложения каллозы в КС предоставляют возможность контроля переноса воды и растворенных веществ во многих частях растения и на критических стадиях развития [11]. В *Arabidopsis thaliana* L. (резуховидка Таля) β -1,3-глюкансинтазы (каллозосинтазы) кодируются 12 генами, принадлежащими семейству гликозилтрансфераз 48 (в базе данных CAZY) и которые названы как *GLUCAN SYNTHASE-LIKE*, *GSL1–GSL12* [12]. Немного позже другими авторами эти гены были названы *CALS1–CALS12* [13], при этом нумерация не совпадала. В данной работе мы придерживались номенклатуры Richmond и Somerville [12]. Согласно функциональным характеристикам генов *GSL*, представители различных подсемейств играют частично избыточные роли в регуляции множества процессов [10].

Во многих источниках указывают необходимость контроля метаболизма каллозы как путем биосинтеза каллозосинтазами, так и путем ее деградации с помощью β -1,3-глюканаз (BGs). Гены β -1,3-глюканаз экспрессируются в различных тканях растений в зависимости от типа ткани и стадии развития, а также действия биотических и абиотических стрессоров [10, 11]. Растительные β -1,3-глюканазы (BG) принадлежат к семейству гликозидгидролаз GH17 [14]. Используя расширенный филогенетический анализ в сочетании с информацией об экспрессии генов β -1,3-глюканаз и доменной структуры их белковых последовательностей, 50 BGs *A. thaliana* были разделены на пять групп [15]. Следует отметить, что растительным β -1,3-глю-

каназам уделяли значительное внимание как важным участникам взаимодействия растений с микроорганизмами, поскольку большое количество BGs включено в процессы, связанные с патогенезом — pathogenesis-related (PR). Этот тип BGs накапливается в случае атаки патогена. Некоторые из BGs непосредственно участвуют в гидролизе КС патогена, в связи с чем трансгенная экспрессия генов BG широко используется в качестве стратегии для развития устойчивости культурных растений к грибковым патогенам [15]. BGs также участвуют в деградации каллозы при созревании пыльцы, во время роста пыльцевой трубки и при контроле пропускной способности плазмодесм. Накопление и деградация каллозных отложений имеет значение для множества процессов развития, таких как прорастание, рост пазушных почек, органогенез боковых корней, апикальный рост побегов или дифференцировка устьиц [10, 15].

Мы предположили, что в волокнах льна каллозе принадлежит особая роль в ходе реализации гравитропической реакции. Кроме этого, практически отсутствуют данные о наличии каллозы в волокнах в норме на разных стадиях развития. Рост флоэмных волокон льна и отложение утолщенной клеточной стенки разделены во времени и пространстве: после инициации и непродолжительной стадии координированного роста волокно растет интрузивно (скорость роста волокна превышает скорость роста соседних клеток) [16]. После достижения определенной длины (до нескольких сантиметров) волокна льна начинают формировать утолщенную клеточную стенку: тонкий слой вторичной клеточной стенки, а затем третичную клеточную стенку, которая характеризуется высоким содержанием целлюлозы и низким содержанием ксилана и лигнина [2]. Увеличение экспрессии некоторых генов ферментов биосинтеза и деградации каллозы было выявлено в интрузивно растущих волокнах [17], но при этом нет данных об экспрессии генов этих ферментов в волокнах на стадии формирования утолщенной клеточной стенки. В проведенных ранее экспериментах по гравистимуляции растений льна были описаны морфологические изменения волокон, имеющих зрелую ТКС на верхней стороне стебля (“тянущей”, pulling). В этих же волокнах на продольных срезах была обнаружена каллоза в структурах, напоминающие “перетяжки” [7].

Цель работы — анализ экспрессии генов β -1,3-глюкансинтаз и β -1,3-глюканаз, отвечающих за метаболизм каллозы, на уровне отдельных клеток — волокон льна, находящихся на разных стадиях развития и при гравииответе. Это первое исследование, посвященное инвентаризации этих генов и анализу их экспрессии при гравииответе в волокнах льна.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Идентификация генов. В работе при использовании базы данных Phytozome были выявлены последовательности белков, содержащие функциональные домены (PFAM) генов β -1,3-глюкансинтаз (PF02364 и PF04652), и генов, кодирующих гликозидгидролазы 17 (PF00332). Идентифицированные гены у льна (*Linum usitatissimum* L.) были названы в соответствии с ближайшей гомологичной последовательностью *A. thaliana*; функции продуктов всех выявленных генов являются предположительными, поскольку их аннотация построена исключительно на гомологии к охарактеризованным генам *A. thaliana*. Доменную структуру генов анализировали с помощью сервиса InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>). Наличие трансмембранных доменов анализировали с помощью сервиса TMHMM (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>), GPI-якорь (гликозилфосфатидилинозитол) предсказывали с помощью сервиса NetGPI-1.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetGPI-1.1/>).

Уровень экспрессии генов. Для оценки экспрессии генов мы использовали полученные нами ранее транскриптомные данные для растений льна (фаза быстрого роста), которые размещены в базе данных FIBexDB (<https://ssl.cres-t.org/fibex/flax/>). В FIBexDB транскриптомные данные из девяти разных проектов (61 образец) нормализованы и сведены в единую информационную базу с соответствующей статистической обработкой значений дифференциальной экспрессии, включая оценку критериев достоверности (P и q) [18]. Все транскриптомные данные были ранее опубликованы, ссылки на

номера проектов в NCBI с сырыми данными приведены на рисунке 1. Для анализа брали флоэмные волокна до формирования ТКС (фаза интрузивного роста) – (iFIBa), на начальной стадии формирования ТКС – (tFIBa), на поздней стадии формирования ТКС (tFIBb) и на разных сторонах стебля (PUL – верхняя при подъеме растения, OPP – нижняя) поздней стадии формирования ТКС. Экспрессию генов в волокнах анализировали через 8, 24 и 96 ч после наклона растений (рис. 1). Обсуждаются более чем двукратные достоверные ($q < 0.05$) изменения экспрессии между контрольными (tFIBb) и гравистимулированными растениями (PUL и OPP). На рисунках 2–6 представлены значения средних и стандартные отклонения, знаком “*”, “b”, “c” отмечены достоверные различия между образцами при $q < 0.05$. Для подтверждения достоверного различия между PUL и OPP дополнительно проводили t -test при $P < 0.05$.

Филогенетический анализ. Отбор аминокислотных последовательностей для филогенетического анализа проводили в базе данных Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) по соответствующим номерам PFAM. Предварительно аминокислотные последовательности *A. thaliana* и *L. usitatissimum* были выравнены в веб-сервисе M-Coffee (<https://tcoffee.crg.eu/>): для GSLs использовали PSI/TM-Coffee (алгоритм для выравнивания мембраносвязанных белков), для GH17 – M-Coffee. Укороченные последовательности не использовали для выравнивания. Для построения филогенетического дерева аминокислотных последовательностей GSLs *A. thaliana* (12) и *L. usitatissimum* (27) использовали метод Q.pfam+I+G4, для GH17

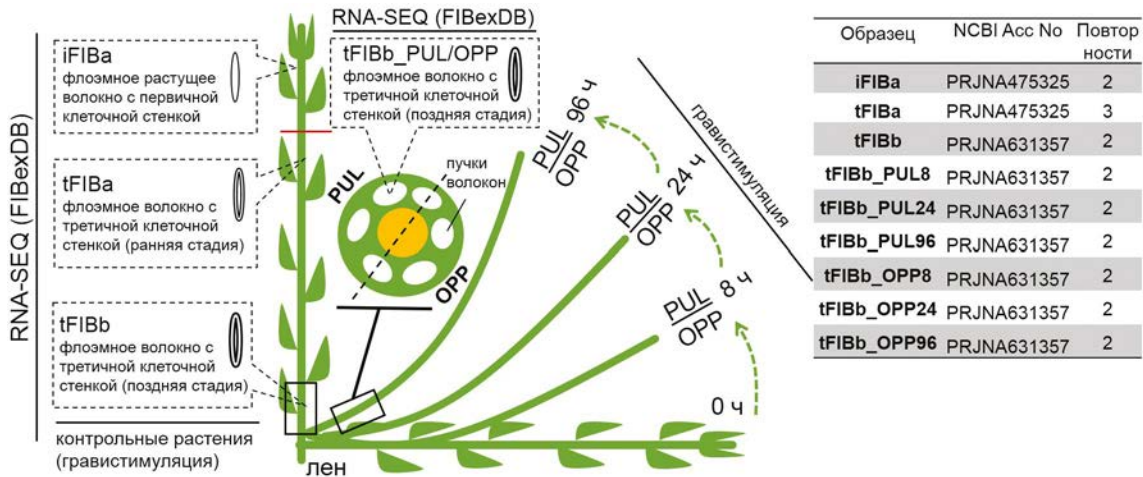


Рис. 1. Схема отбора образцов (изолированных волокон льна) для оценки экспрессии генов. Данные экспрессии загружены в FIBexDB [18]; iFIBa – интрузивно растущие волокна, tFIBa – ранняя стадия формирования ТКС (третичной клеточной стенки), tFIBb – поздняя стадия формирования ТКС; 8, 24, 96 ч – время фиксации образцов после наклона стебля; PUL – pulling side (тянущая сторона), OPP – противоположная PUL-стороне. Справа в таблице приведены номера проектов в NCBI, в которых опубликованы сырые данные транскриптомных анализов. Нормализованные данные для всех транскриптомных экспериментов можно найти в FIBexDB (<https://ssl.cres-t.org/fibex/flax/>).

A. thaliana (51) и *L. usitatissimum* (86) — метод Q.pfam+R7; ультрафаст бутстреп поддержка составила 10 000. Расчеты моделей и деревьев выполнены в программе IQTREE (<http://www.iqtree.org/>, версия 2.2.2.6), визуализация выполнена с помощью сервиса iTOL (<https://itol.embl.de/>). Деревья для двух классов ферментов приведены в дополнительных материалах электронной версии статьи.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Идентификация и анализ уровня экспрессии генов предполагаемых β -1,3- β -глюкансинтаз в волокнах льна. Всего в геноме льна было выявлено 28 генов (26 генов с PF02364, 2 гена с PF04652) *LusGSLs*, гомологичных 10 генам *A. thaliana* (рис. 2; Дополнительные материалы, рис. 1). Согласно филогенетическому анализу, наибольшая диверсификация характерна для льняных последовательностей, гомологичных ATGSL2 и кладе ATGSL7/11. Далее по тексту ближайшие гомологи обсуждаемых генов по *A. thaliana* (согласно филогенетическому анализу и результатам BLAST) будут приводиться в скобках.

Были выявлены *LusGSLs* с явным максимум экспрессии на определенной стадии развития волокна, которые были разделены на четыре кластера (рис. 2). *Lus10002096* (ATGSL2), *Lus10000830* (ATGSL2) и *Lus10030030* (ATGSL5) — гены, имеющие максимум в волокнах со зрелой ТКС (рис. 2, кластер 1). *Lus10037469* (ATGSL6) имел максимум экспрессии в начале формирования ТКС с ее уменьшением более чем в три раза в волокнах со зрелой ТКС (рис. 2, кластер 2). *Lus10039199* (ATGSL12) и *Lus10013744* (ATGSL12) имели максимальный уровень экспрессии на стадии интрузивного роста с достоверным уменьшением экспрессии в 5–10 раз в волокнах со зрелой ТКС (рис. 2, кластер 3). Около половины генов вошли в четвертый кластер, в который были объединены гены с максимумом экспрессии на стадии интрузивного роста, а также на ранней стадии формирования ТКС (рис. 2). В целом при гравистимуляции изменение экспрессии в волокнах наблюдали у 21 гена (достоверно по сравнению с контролем хотя бы в одной временной точке). Среди них только для *Lus10014601* (ATGSL1), *Lus10042478* (ATGSL4) и паралога *Lus10033689* и *Lus10031648* (общий ближайший гомолог ATGSL5) было отмечено увеличение экспрессии в волокнах при гравистимуляции по сравнению с волокнами контрольных растений (рис. 2). Среди оставшихся 17 генов *LusGSLs* было показано достоверное уменьшение экспрессии в волокнах при гравистимуляции по сравнению с волокнами контрольных растений (рис. 2). Разная динамика экспрессии

выделенных генов представлена на рисунках 3а и 3б. Мы исключили из дальнейшего анализа ген *Lus10000831* ввиду отсутствия у транслированной последовательности трансмембранного домена, необходимого для белков этого семейства, при этом ген *Lus10000830* (соседний локус) имел аналогичную динамику экспрессии и его транслированная белковая последовательность включала пять трансмембранных доменов. По похожим причинам не рассматривали ген *Lus10020751* (соседство с локусом *Lus10020750* и уменьшенное количество трансмембранных доменов). Мы также исключили из дальнейшего анализа ген *Lus10033482* по причине низких значений экспрессии ($TGR < 16$ в образцах в эксперименте с гравистимуляцией).

Среди отобранных генов нами была выделена группа высокоэкспрессирующихся генов, уменьшение экспрессии которых более чем в три раза наблюдалось через 24 ч после наклона (рис. 4а). В нее вошли четыре гена *Lus10020750*, *Lus10001424*, *Lus10001056*, *Lus10007327*, которые имели один общий ближайший гомолог в *A. thaliana* AT1G06490, аннотированный как ATGSL7. Данные гены к тому же имели похожий профиль экспрессии с максимумом в волокнах на стадии интрузивного роста. Гены с более низким уровнем экспрессии (*Lus10002097*, *Lus10000830*, *Lus10033483*; ближайшим гомологом является AT2G13680 (ATGSL2)) (рис. 4б) имели различия в экспрессионных максимумах, проявляющихся на разных стадиях развития волокна, но при этом все они имели похожий профиль экспрессии при гравистимуляции: незначительное уменьшение через 8 ч после наклона, максимальное уменьшение (более чем в три раза по сравнению с контролем) через 24 ч после наклона и небольшое увеличение к концу реакции (96 ч).

Таким образом, большинство генов *LusGSL* имели максимум экспрессии в волокнах на стадии интрузивного роста, когда молодые волокна активно растут интрузивно, достигая в длину нескольких сантиметров [16], и в волокнах на ранней стадии формирования ТКС. В ходе гравитоответа для *LusGSL* в основном наблюдали понижение экспрессии (более выраженное в волокнах PUL-стороны стебля), кроме предполагаемых *LusGSL5*, *LusGSL4* и *LusGSL1*. Максимальное понижение в ходе гравитоответа проявляли высокоэкспрессируемые гены, гомологичные ATGSL7 и ATGSL2.

Идентификация и анализ уровня экспрессии генов β -1,3-глюканаз в волокнах льна. В геноме льна было выявлено 96 генов, кодирующих гликозидгидролазы 17 (GH17, PF00332) и соответствующих 34 гомологам в *A. thaliana*. Для этого семейства гидролаз в базе данных CAZY (<http://www.cazy.org/GH17.html>) описаны следующие

	Lus	PFAM	At	iFIBa	tFIBa	CTR	tFIBb	PUL8	PUL24	PUL96	OPP8	OPP24	OPP96
①	Lus10002096	PF02364	AT2G13680_GSL2	768 ^{bc}	1110 ^c	1540	1411	625*	844*	1159	658*	837*	
	Lus10000830	PF02364	AT2G13680_GSL2	78 ^c	50 ^c	169	89*	33*	47*	98*	30*	53*	
	Lus10030030	PF02364	AT4G03550_GSL5	1 ^c	6 ^c	92	46	19	3*	27	20	5*	
	Lus10000831	PF02364	AT2G13680_GSL2	15	9	27	17	2*	6	15	4	6	
②	Lus10037469	PF02364	AT1G05570_GSL6	3423 ^{bc}	6910 ^c	2257	1785	1130*	2417	2251	1447*	2196	
	Lus10020893	PF02364	AT2G13680_GSL2	113 ^c	160 ^c	64	63	25*	26*	63	35	49	
	Lus10033483	PF02364	AT2G13680_GSL2	42	83	59	48	17*	31	68	23	31	
	Lus10033482	PF02364	AT2G13680_GSL2	18	73	6	4	1	1	6	3	1	
③	Lus10039199	PF02364	AT5G13000_GSL12	10625 ^{bc}	4951 ^c	1933	2205	832*	2165	2042	1029*	1690	
	Lus10013744	PF02364	AT5G13000_GSL12	8335 ^{bc}	4205 ^c	1858	1862	862*	1705	1981	1034*	1456	
	Lus10039828	PF02364	AT4G03550_GSL5	436 ^b	139 ^c	37	52	35	36	40	45	32	
	Lus10000266	PF02364	AT4G03550_GSL5	401 ^b	128 ^c	36	50	34	35	40	44	32	
④	Lus10014601	PF02364	AT4G04970_GSL1	191 ^{bc}	104	81	106	51	60	155*	89	55	
	Lus10032463	PF02364	AT3G07160_GSL10	5056 ^c	4401 ^c	1305	1392	1049	1410	1408	1178	1261	
	Lus10003920	PF02364	AT1G05570_GSL6	4687 ^c	5318 ^c	1893	1530	795*	1549	1877	1035*	1366	
	Lus10014796	PF02364	AT2G36850_GSL8	4292 ^c	3746 ^c	1588	1515	1030*	1243	1502	1060*	1102*	
	Lus10042478	PF02364	AT3G14570_GSL4	4176 ^c	4089 ^c	1414	2364	960	1098	2943*	1142	1231	
	Lus10042959	PF02364	AT3G07160_GSL10	3496 ^c	2958 ^c	1067	971	618*	924	1004	714*	747*	
	Lus10020750	PF02364	AT1G06490_GSL7	2815 ^c	2271	1306	938	356*	1021	1060	511*	879	
	Lus10040891	PF02364	AT2G36850_GSL8	2269 ^c	2254 ^c	1637	1442	853*	1121*	1288	786*	1030*	
	Lus10033689	PF02364	AT4G03550_GSL5	2151 ^c	2183 ^c	334	760*	808*	810*	757*	997*	710*	
	Lus10031648	PF02364	AT4G03550_GSL5	1736	1691 ^c	234	532*	463*	578*	486*	571*	492*	
	Lus10001424	PF02364	AT1G06490_GSL7	1482 ^c	1190 ^c	711	430	121*	271*	422	144*	254*	
	Lus10001056	PF02364	AT1G06490_GSL7	1346 ^c	1027	792	439	131*	285*	427*	139*	271	
Lus10007327	PF02364	AT1G06490_GSL7	738	587	575	364	107*	289*	371	143*	249*		
Lus10002097	PF02364	AT2G13680_GSL2	383 ^c	285	135	114	5*	38*	123	28*	24*		
Lus10020751	PF04652	AT1G06490_GSL7	1996	1494 ^c	219	198	37*	201	206	110	166		
Lus10037471	PF04652	AT2G31960_GSL3	1470 ^b	343	200	228	260	272	214	255	207		

Рис. 2. Перечень генов β-1,3-глюкансинтаз (PF02364, PF04652) и их экспрессия в волокнах льна на разных стадиях развития и при гравистимуляции (в TGR) с разбивкой на кластеры 1–4. Гены, экспрессия которых была достоверно снижена при гравистимуляции в волокнах стебля льна, обозначены синим; гены, экспрессия которых достоверно увеличивалась в волокнах при гравистимуляции по сравнению с экспрессией в волокнах контрольных растений (tFIBb), обозначены красным. * ^(c) – Различия с контролем (tFIBb) и ^(b) – различия с tFIBa достоверны при $q < 0.05$. Серым фоном выделены гены, экспрессию которых не рассматривали. iFIBa – интрузивно растущие волокна, tFIBa – ранняя стадия формирования ТКС (третичной клеточной стенки). tFIBb – поздняя стадия формирования ТКС, которая служила контролем (CTR) в эксперименте с гравистимуляцией. 8, 24, 96 ч – время фиксации образцов после наклона стебля; PUL – pulling side (тянущая сторона), OPP – противоположная PUL-стороне. Lus – последовательности льна *Linum usitatissimum*, At – последовательности *Arabidopsis thaliana*.

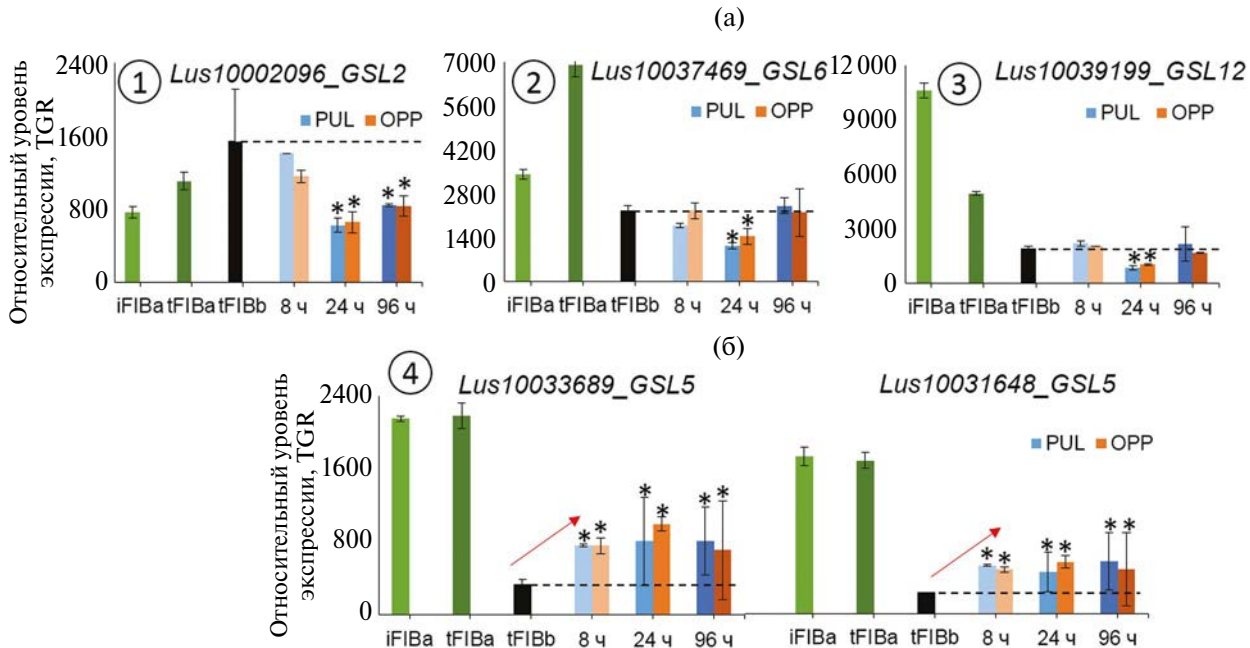


Рис. 3. Экспрессия генов β-1,3-глюкансинтаз (PF02364) в волокнах стебля льна из кластеров 1–4 с максимумом на разных стадиях развития и уменьшением экспрессии при гравитовзвешивании (а), а также резко понижающих экспрессию в волокнах со зрелой клеточной стенкой (tFIBb) по сравнению с iFIBa и tFIBa, но активирующихся при гравитовзвешивании (б). * – Различия с контролем достоверны при $q < 0.05$. iFIBa – интрузивно растущие волокна, tFIBa – ранняя стадия формирования ТКС (третичной клеточной стенки). tFIBb – поздняя стадия формирования ТКС. 8, 24, 96 ч – время фиксации образцов после наклона стебля; PUL – pulling side (тянущая сторона), OPP – противоположная PUL стороне. Черной пунктирной линией обозначен уровень экспрессии в контрольных растениях без гравистимуляции.

активности: глюкан эндо-1,3- β -глюкозидаза (EC 3.2.1.39); лихеназа (EC 3.2.1.73); АБК-специфическая β -глюкозидаза (EC 3.2.1.175); β -1,3-глюкан-трансгликозидаза (EC 2.4.1.-); β -1,3-глюкозидаза (EC 3.2.1.-). Во льне это семейство, главным образом, представлено β -1,3-глюканазами (BGs). В нашем исследовании 69 из 96 генов *GH17* экспрессировались во флоэмных волокнах на разных стадиях развития (TGR > 16 хотя бы в одном из образцов). Треть всех экспрессируемых генов *GH17* была активирована в волокнах во время интрузивного роста. Для дальнейшего анализа мы отобрали 21 ген, экспрессия которых в три и более раза изменялась в волокнах при гравистимуляции в любой временной точке по сравнению с контролем (tFIBb) (рис. 5). Согласно филогенетическому анализу, обсуждаемые гены принадлежат к разным группам обширного семейства *GH17* и, по всей видимости, для них характерна эндо- и экзогидролазная активность, при этом многие ферменты аннотированы как *GH17* без указания на тип активности (рис. 5; Дополнительные материалы, рис. 2).

По профилю экспрессии мы выделили четыре группы генов. В первую вошли гены *Lus10015151*,

Lus10016539, *Lus10033244*, *Lus10034607*, *Lus10040808*, *Lus10016032*, имеющие максимальное значение экспрессии в волокнах во время интрузивного роста. При формировании ТКС эти значения падали, но при гравистимуляции мы наблюдали их повышение до значений экспрессии в волокнах на ранней стадии формирования ТКС (иногда — до значений экспрессии в интрузивно растущих волокнах), часто с максимумом через 24 ч после наклона. После подъема растений (96 ч) значения экспрессии в волокнах гравистимулированных растений были выше контрольных значений. Такая закономерность имела место в волокнах обеих сторон стебля растений льна (PUL и OPP) (рис. 5). Вторая группа генов (*Lus10012080*, *Lus10032719*, *Lus10023576*) имела максимальные значения экспрессии в волокнах на ранней стадии формирования ТКС и пониженные значения экспрессии в волокнах со зрелой ТКС; при гравистимуляции уровень экспрессии этих генов также повышался. В итоге, к моменту подъема растений (96 ч) значения экспрессии (PUL и OPP) возрастали и были близки тем, что наблюдали в волокнах на ранней стадии формирования ТКС. В третью

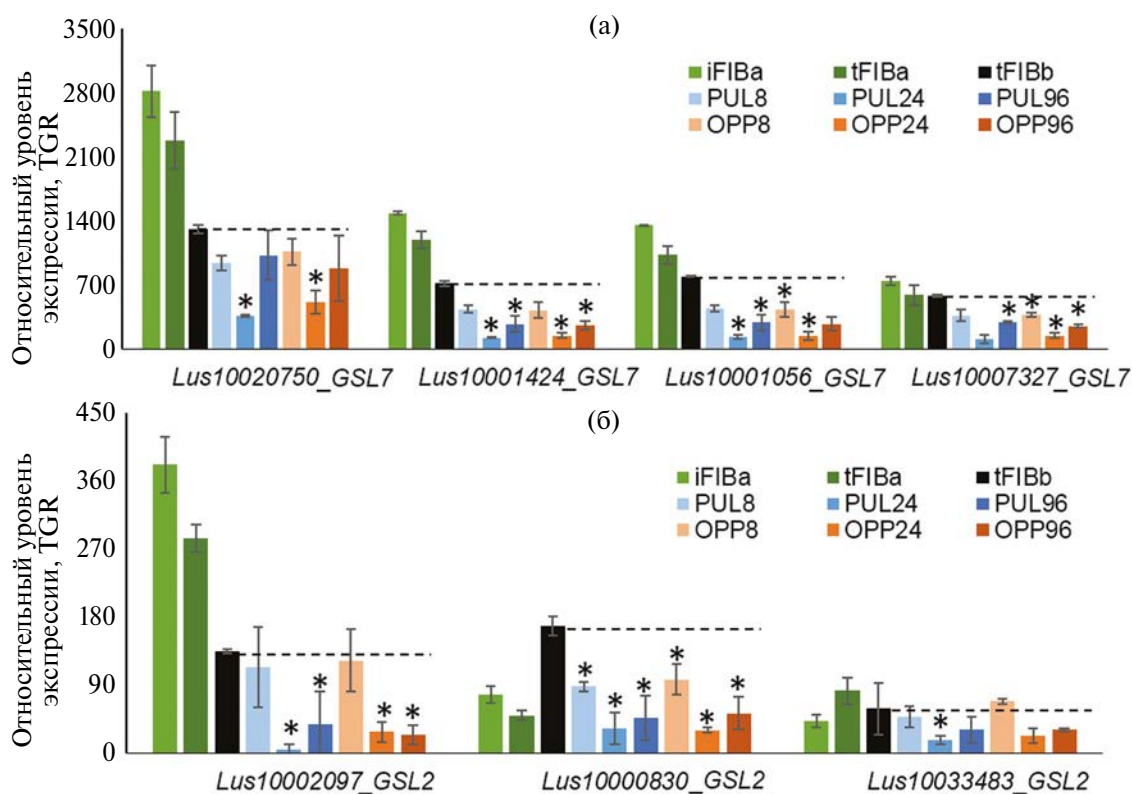
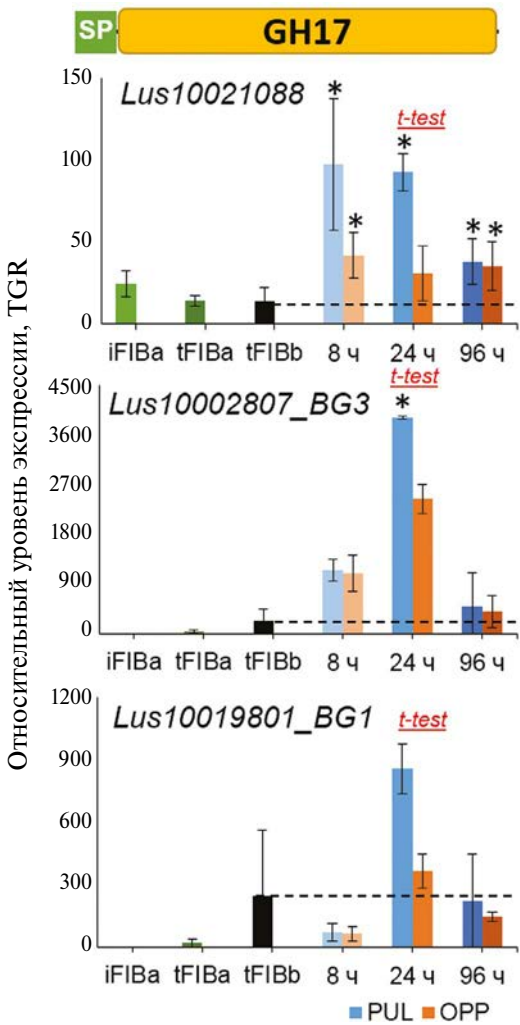


Рис. 4. Гены β -1,3-глюкансинтаз (PF02364), гомологичные ATGSL7 (а) и ATGSL2 (б), имеющие высокий уровень экспрессии в волокнах льна на разных стадиях развития, но понижающие экспрессию при гравистимуляции. * — Различия с контролем достоверны при $q < 0.05$. iFIBa — интрузивно растущие волокна, tFIBa — ранняя стадия формирования ТКС (третичной клеточной стенки). tFIBb — поздняя стадия формирования ТКС. 8, 24, 96 ч — время фиксации образцов после наклона стебля; PUL — pulling side (тянущая сторона), OPP — противоположная PUL стороне. TGR — total gene reads. Черной пунктирной линией обозначен уровень экспрессии в контрольных растениях без гравистимуляции.

	Описание в Phytozome	Lus	At	CTR								
				iFIBa	tFIBa	tFIBb	PUL8	PUL24	PUL96	OPP8	OPP24	OPP96
①	O-GLYCOSYL HYDROLASE 17	Lus10015151	AT2G05790	1556 ^a	466 ^a	188	424*	671*	348*	378*	739	323*
	GLUCOSIDASE-LIKE	Lus10016539 ^a	AT3G46570	720 ^{bc}	403 ^c	185	599*	659*	272	592*	623	296*
	ENDO-1,3-BETA-GLUCOSIDASE 10_R	Lus10033244 ^a	AT1G32860	527 ^c	278 ^c	96	433*	853*	547*	235*	743	384*
	ENDO-1,3-BETA-GLUCOSIDASE 3	Lus10034607 ^a	AT2G01630	369 ^c	94 ^c	75	94	306*	138	109	330	128
	GLUCOSIDASE-LIKE	Lus10040808 ^a	AT3G46570	504 ^b	124 ^c	66	228*	128*	101	193*	126	86
②	GLUCOSIDASE-LIKE	Lus10016032	AT3G46570	527 ^b	122 ^c	50	158*	151*	163*	127*	122*	141*
	ENDO-1,3-BETA-GLUCOSIDASE 7_R	Lus10012080	AT5G42720	3238 ^b	5811 ^b	1348	2139	2146	4072*	2398	2483	3102
	ENDO-1,3-BETA-GLUCOSIDASE 7_R	Lus10032719	AT5G42720	363 ^b	1094 ^a	325	588	646	1070*	538	733	857
	ENDO-1,3-BETA-GLUCOSIDASE 7_R	Lus10023576	AT5G42720	46 ^{bc}	399 ^c	100	248*	324*	251*	324*	290*	217*
	β-1,3-GLUCANASE	Lus10002807	AT3G57240_BG3	1 ^{bc}	40	230	1149	3920*	490	1095	2445	400
③	β-1,3-GLUCANASE	Lus10027860	AT3G57260_BG2	1 ^{bc}	202	224	188	1948	200	135	1276	272
	β-1,3-GLUCANASE	Lus10014109	AT3G57270_BG1	1 ^{bc}	19	101	44	605	122	45	305	77
	β-1,3-GLUCANASE	Lus10027859	AT3G57240_BG3	1 ^{bc}	18	39	82	149	28	94	74	24
	β-1,3-GLUCANASE	Lus10019801	AT3G57270_BG1	1 ^{bc}	20 ^c	244	71	857	220	65	367	144
	GLUCOSIDASE-LIKE PROTEIN	Lus10021088	AT3G46570	24	14	14	97*	93*	38*	42*	31	35*
④	ENDO-1,3-BETA-GLUCOSIDASE	Lus10013016	AT5G55180	7 ^c	13 ^c	45	80	35	14*	78	25*	13*
	O-GLYCOSYL HYDROLASE 17	Lus10025892	AT3G07320	416 ^c	260 ^c	1352	1556	385*	568*	1119	381*	659
	O-GLYCOSYL HYDROLASE 17	Lus10006659	AT2G26600	244 ^{bc}	557 ^c	771	439*	299*	443*	433*	247*	508*
	O-GLYCOSYL HYDROLASE 17	Lus10043075 ^a	AT5G20870	138 ^{bc}	301	423	119*	130*	182	133*	118*	156*
	O-GLYCOSYL HYDROLASE 17	Lus10001183 ^a	AT5G20870	101 ^{bc}	232	327	107*	94*	127	116*	94*	137*
	O-GLYCOSYL HYDROLASE 17	Lus10002808	AT5G67460	196	156	223	100*	66*	215	145	67*	170

Рис. 5. Перечень генов гликозидгидролаз 17 семейства (PF00332) и их экспрессия в волокнах стебля льна (в TGR). Слева от тепловой карты – гены льна (и их ближайшие гомологи в *Arabidopsis thaliana*), проявляющие изменение экспрессии при гравитовете более чем в 3 раза (как минимум, в одном образце); выделены гены, максимально экспрессируемые только в ходе гравитовета. * ^(c) – Различия с контролем (tFIBb) и ^b – различия с tFIBa достоверны при $q < 0.05$. iFIBa – интрузивно растущие волокна, tFIBa – ранняя стадия формирования ТКС (третичной клеточной стенки). tFIBb – поздняя стадия формирования ТКС, которая служила контролем (CTR) в эксперименте с гравитостимуляцией. 8, 24, 96 ч – время фиксации образцов после наклона стебля; PUL – pulling side (тянущая сторона), OPP – противоположная PUL стороне. Lus – последовательности льна *Linum usitatissimum*, At – последовательности *Arabidopsis thaliana*. BG – β-1,3-glucanase. Справа отмечены образцы, в которых экспрессия гена была максимальной. ^g – предсказанный GPI-якорь (коэффициент 0.173–0.503).



группу вошли гены *Lus10002807*, *Lus10019801* и *Lus10021088*, у которых происходило значительное увеличение экспрессии в волокнах только при гравитовете (рис. 6). При этом у всех представителей этой группы рост экспрессии более ярко был выражен в PUL-образцах через 24 ч, иногда превышая OPP в несколько раз. Однако через 96 ч наблюдалось снижение экспрессии и ее выравнивание между PUL и OPP. Доменная структура белков, кодируемых генами этой группы, включала только домен семейства гликозидгидролаз 17 (GH17) (домен X8, который содержат некоторые представители PF00332 выявлен не был). Все белки содержали сигнальный пептид, что позволяет предполагать их секрецию в клеточную стенку. В четвертую группу вошли гены,

Рис. 6. Гены β-1,3-глюканаз, экспрессия которых повышалась в PUL-волокнах при гравитостимуляции по сравнению с OPP. Сверху представлена доменная организация соответствующих белковых последовательностей: SP – сигнальный пептид, GH17 – Glycosyl hydrolase family 17. * – Различия с контролем достоверно при $q < 0.05$; t-test – различия между образцами достоверны при $P < 0.05$. iFIBa – интрузивно растущие волокна, tFIBa – ранняя стадия формирования ТКС (третичной клеточной стенки), tFIBb – поздняя стадия формирования ТКС. 8, 24, 96 ч – время фиксации образцов после наклона стебля; PUL – pulling side (тянущая сторона), OPP – противоположная PUL стороне. TGR – total gene reads. Черной пунктирной линией обозначен уровень экспрессии в контрольных растениях без гравитостимуляции.

которые имели максимум экспрессии в волокнах со зрелой ТКС и понижали экспрессию при гравистимуляции на обеих сторонах стебля (рис. 5).

Таким образом, в результате анализа экспрессии генов ферментов GH17 было показано, что для каждой стадии развития волокна соответствует разный набор активирующихся генов. Были выявлены β -1,3-глюканазы, экспрессия которых значительно повышалась только в ходе гравитропической реакции, при этом пик экспрессии для большинства генов этой группы приходился на 24 ч.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что реабилитация пространственного положения стебля растения льна связана с модификацией флоэмных волокон, формирующих ТКС, что предполагает важную роль этих клеток в гравитовете. В таких волокнах на PUL-стороне была обнаружена каллоза [7]. В данной работе в результате инвентаризации в геноме льна выявлено 28 генов, гомологичных генам β -1,3-глюкансинтаз (CALSs/GSL), и 96 генов, гомологичных генам гликозидгидролаз 17 семейства (GH17). Проведен анализ их экспрессии на разных стадиях развития волокна и при гравистимуляции. При гравистимуляции изучали клетки (флоэмные волокна), закончившие свой рост и формирующие ТКС. Нужно отметить, что стадии развития волокон разделены во времени и пространстве (рис. 1), что позволяет исследовать стадия-специфичные процессы и находить стадия-специфичные гены.

В ходе гравистимуляции экспрессия генов большинства предполагаемых β -1,3-глюкансинтаз в волокнах льна понижается. Большинство выявленных в геноме льна генов *GSLs* имели максимальный уровень экспрессии в волокнах на стадии интрузивного роста и сохраняли достаточно высокий уровень на стадии начала формирования ТКС (рис. 2, кластеры 3, 4). Важность кодируемых ими ферментов связывают с их участием в биосинтезе каллозы, необходимой для закрытия плазмодесм при переходе волокна от координированного роста к интрузивному [17]. У некоторых генов этой группы при гравитовете экспрессия достоверно снижалась в образцах, полученных через 24 ч (96 ч) после наклона растений, соответствующие гомологи — *AT5G13000* (*GSL12*), *AT1G05570* (*GSL6*), *AT2G36850* (*GSL8*) и *AT3G07160* (*GSL10*). Что примечательно, для всех продуктов этих генов показано участие в проницаемости плазмодесм [19–23]. Например, для *ATGSL6* (*CALS1*) продемонстрировано участие в отложении каллозы в плазмодесмах (ПД) в ответ на обработку салициловой кислотой [19], а также участие в закрытии ПД в ходе иммун-

ной реакции у *A. thaliana* [20]. Необходимо отметить, что среди высокоэкспрессируемых генов этой группы мы выделили также гены, которые достоверно уменьшали экспрессию в ходе гравистимуляции на обеих сторонах стебля и имели общего ближайшего гомолога *ATGSL7* (рис. 4а). Продукт этого гена в *A. thaliana* также участвовал в отложении каллозы в ПД [23]. Мутантные формы, дефектные по *CALS7*, демонстрировали пониженное накопление каллозы в ПД зарождающихся ситовидных пластинок и стенках радиальных ситовидных элементов на ранней стадии развития флоэмы (стадия перфорации) в проростках *A. thaliana*, что в конечном итоге приводило к формированию ситовидных элементов с меньшим количеством ПД [23]. Однако экспрессия *GSL7* обнаружена только в ситовидных элементах флоэмы и сопутствующих клетках, что предполагает тканеспецифичный характер экспрессии *GSL7* [23]. В подтверждение этого, мутанты *gs17* не обнаруживали каких-либо других фенотипических дефектов, откуда следует, что *GSL7* не выполняет никаких других биологических функций, кроме специфичного для флоэмы синтеза каллозы в ПД [10]. При этом следует отметить, что в интрузивно растущих волокнах не обнаружено плазмодесм, которые присутствуют на стадии координированного роста, а потом исчезают, и волокно становится симпластически изолированным [16]. Мы допускаем, что в процессе выделения волокон были частично захвачены граничащие с волокнами проводящие элементы флоэмы, но также и не исключаем экспрессии этого гена в первичных волокнах флоэмы. В любом случае, экспрессия данного гена уменьшалась при гравитовете более чем в три раза. Возможно, это необходимо, чтобы поддерживать активный транспорт ассимилятов по флоэме в ходе гравитовета.

Часть генов *GSL* (около 15%) имела максимальные значения экспрессии в волокнах со зрелой КС и сильное уменьшение экспрессии при гравитовете, достигающее до значений экспрессии во время интрузивного роста: *Lus10000830*, *Lus10002096*, *Lus10033483* (*AT2G13680* (*ATGSL2*)). Показано, что глюкансинтаза *ATGSL2* активируется, главным образом, на поздней стадии развития пыльцы и пыльцевой трубки [10]. В растущей пыльцевой трубке каллоза является преобладающим полисахаридом в субапикальной КС, придающим ей одновременно жесткость и гибкость, возможно, при взаимодействии с целлюлозой. Механические свойства КС пыльцевой трубки позволяют пыльцевой трубке эффективно перемещаться [10]. Показано, что за отложение каллозных пробок в пыльцевых трубках отвечает *GSL2* [(10)]. Исследуемые нами флоэмные волокна — очень длинные клетки, где ранее обнаружены каллозные пробки [7]. Повышенная экспрес-

сия *LusGSL2* в волокнах с ТКС, как показано в настоящем исследовании, косвенно может свидетельствовать об участии каллозы в создании особых механических свойств ТКС волокна в норме и в ходе гравитовета, что нуждается в дальнейшем изучении и подтверждении.

При анализе *LusGSLs* все же необходимо отметить два гена, у которых было двукратное достоверное повышение экспрессии во всех временных точках при гравитовете: *Lus10032648* и *Lus10033689* (гомологичные *ATGSL5*) (рис. 36). Показано, что *ATGSL5* необходим в ответе на грибную инфекцию [25, 26]. Было продемонстрировано, что после заражения листьев *A. thaliana* мучнистой росой индуцированная патогеном каллозосинтаза *ATGSL5* высвобождалась из плазматической мембраны, где она локализовалась в необработанных клетках эпидермиса листьев, и реинтегрировалась в место попытки проникновения гриба для образования локальных каллозных пробок [25]. *ATGSL5* важен и для формирования экзины в КС пыльцевой трубки [27]. Недавно обнаружено, что *ATGSL5* изменяет проницаемость ПД [22]. В волокнах льна эти гены проявляли максимум экспрессии на стадиях интрузивного роста и начала формирования ТКС, многократно понижая экспрессию в зрелых волокнах и вновь увеличивая ее при гравитовете. Поскольку транскрипционные процессы предшествуют функциональному проявлению, по всей видимости, каллоза является необходимым компонентом КС флоэмных волокон льна, как минимум, на стадии формирования ТКС. В тоже время анализ экспрессии всех *LusGSLs* в волокнах льна выявил, главным образом, уменьшение экспрессии при гравитовете, которое наблюдали в основном у генов, для ближайших гомологов которых была показана вовлеченность в формирование пыльцы, пыльцевой трубки, каллозных пробок и в регуляцию ПД. Однако согласно функциональным характеристикам генов *GSL*, эти ферменты могут быть вовлечены в разные биологические процессы [10]. Поэтому говорить о роли обнаруженных дифференциально экспрессирующихся генов преждевременно. К тому же сообщалось, что ПД исчезали во флоэмных волокнах в начале интрузивного роста [16].

В ходе гравитовета выявлено повышение экспрессии генов предполагаемых β-1,3-глюканаз в волокнах льна. Известно, что помимо синтеза, пространственная и временная локализация каллозы контролируется ее селективной деградацией, которую осуществляют растительные β-1,3-глюканазы (BG), принадлежащие семейству GH17. Следует отметить, что аннотация и номенклатура GH17 даже для *A. thaliana* намного слабее проработана и описана, чем номенклатура каллозосинтаз. Глюканазы могут быть обо-

значены в базах данных как GLUCAN ENDO-1,3-BETA-GLUCOSIDASE (что объединяет два типа активности — эндо- (EC 3.2.1.39) и экзо- (EC 3.2.1.58), хотя в некоторых случаях такое название используют как синоним глюканаз) или как β-1,3-GLUCANASE (рис. 5). При этом нумерация генов для этих номенклатур независима или отсутствует. Для многих представителей этого семейства активность вовсе не показана, и они обозначаются как O-GLYCOSYL HYDROLASES FAMILY 17 PROTEIN. Из 96 генов *GH17* для дальнейшего анализа был отобран 21 ген, экспрессия которых значительно отличалась от контроля (рис. 5). Информация по ближайшим гомологам высокоэкспрессируемых генов в волокнах на стадии интрузивного роста и начала формирования ТКС (1 и 2 группа) очень скудная. На основе данных о белок-белковых взаимодействиях и известных белках, ассоциированных с синтезом КС, было выдвинуто предположение, что *AT2G05790* (*Lus10015151*) связан с синтезом КС [28]. Возможно, продукт *Lus10015151* имеет отношение к контролю уровня каллозы в пределах КС. Однако есть данные об увеличении экспрессии *AT1G32860* (гомолог *Lus10033244* — гена группы также с максимумом на стадии интрузивного роста) при холодовом стрессе [29]. Показано также, что плазмодесмоспецифичная глюканаза *AtBG_PPAP* (AT5G42100) имеет наибольшую гомологию с *AT1G32860* (61% идентичности и 73% сходства) [30]. Дифференциальная экспрессия при стрессовых воздействиях (нагрев, солевой и осмотический стрессы) была показана для *AT2G01630* [31], ближайшего гомолога *Lus10034607* (гена этой же группы). Для *AT2G01630* предсказан и подтвержден GPI (гликозилфосфатидилинозитол)-якорь [32], что является необходимым условием в предсказании участия в регуляции плазмодесм путем разрушения каллозы [15]. Нужно отметить, что с помощью сервиса NetGPI-1.1 мы тестировали гены на присутствие GPI-якоря (рис. 5). Из шести белков с предсказанным GPI-якорем (вероятность 0.173–0.503), четыре принадлежали группе белков, гены которых максимально экспрессировались в волокнах на стадии интрузивного роста, но активацию экспрессии которых также наблюдали и при гравистимуляции. На основании данных литературы о гомологичных генах этой группы, их продукты предположительно можно отнести к ферментам, вовлеченным в ростовые процессы (интрузивный рост) и в ответы на стрессовые воздействия. В четвертой группе генов (рис. 5), имеющих повышенный уровень экспрессии в волокнах с ТКС и понижение экспрессии при гравистимуляции, хочется отметить *Lus10025892* (*AT3G07320*). Показано, что экспрессия *AT3G07320* повышалась при сверхэкспрессии *ANAC012* — гена фактора транскрипции

из семейства NAC, вызывающего резкое подавление отложения вторичной КС [33]. Эти данные согласуются с нашими, согласно которым выявлена высокая экспрессия *Lus10025892* в волокнах, имеющих зрелую ТКС, которая формируется после отложения вторичной КС (рис. 5). Некоторые гены *BG* (3 группа, рис. 5) увеличивали экспрессию только в PUL-образцах по сравнению с OPP (рис. 6). Для двух из них ближайшими гомологами были *ATBG1* и *ATBG3*. Продукты этих генов относят к PR-BG [34]. Это значит, что этот тип глюканаз накапливается в случае атаки патогена, разрушая их β -1,3-глюканы, и по своей доменной структуре их относят к пятой группе глюканаз, характеризующейся наличием сигнального пептида и отсутствием доменов CBM (углевод-связывающего) и CTS (гидрофобной С-терминальной последовательности) [15]. Белковая последовательность *Lus10021088* также имеет аналогичную структуру (рис. 6), у нее имеется только сигнальный пептид и домен GH17. Белки семейства PR-BG или PR-2, регулируются стрессовыми условиями и являются частью врожденной иммунной системы растений, сильно индуцируемой во время инвазии патогена наряду с другими PR-генами. Регуляция биосинтеза и активности BG растений происходит на уровнях тканеспецифической экспрессии их генов и компарментализированного накопления. Следовательно, конкретная субклеточная локализация BG имеет решающее значение для его функционирования в различных клеточных процессах [34].

Таким образом, при гравистимуляции растений льна наблюдали уменьшение экспрессии генов ферментов биосинтеза и явное повышение экспрессии генов деградирующих ферментов. Точные механизмы вовлечения каллозы в реализацию гравитропической реакции еще предстоит выяснить. Наша гипотеза заключается в том, что каллоза, являясь структурным компонентом КС волокна, может хорошо удерживать воду и сдерживать “сокращение” (натяжение) волокна в ходе его развития, в том числе и при формировании ТКС. В связи с этим, при гравистимуляции появляется необходимость гидролиза этого полисахарида, чтобы снизить напряжение в КС. Это объясняет увеличение экспрессии генов BGs, особенно на верхней стороне стебля, которую мы называем тянущей, где предполагается “сокращение” волокон. При этом по длине волокна в некоторых местах могут образовываться (или оставаться) каллозные пробки, которые, в свою очередь, могли бы ограничивать пропускную способность важных соединений между возникшими септами. Учитывая, что волокна — очень длинные клетки, септирование с помощью каллозных пробок могло бы облегчить их функциональную (“мышечную”) активность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в данном исследовании в *Linum usitatissimum* были выявлены гены, кодирующие белки, потенциально участвующие в метаболизме каллозы: 28 генов, гомологичных генам каллозосинтаз (GSLs), и 96 генов, гомологичных генам гликозидгидролаз 17 семейства (GH17). Охарактеризован профиль экспрессии, главным образом, генов с высоким значением экспрессии либо проявляющих изменение экспрессии при гравистимуляции. В связи с тем, что в волокнах на стадии интрузивного роста и на ранней стадии формирования ТКС часто наблюдали максимумы экспрессии как для *GSLs*, так и для *GH17* можно предположить активный метаболизм каллозы в клеточной стенке волокна как на стадии его роста растяжением, так и на стадии утолщения клеточной стенки. Если при гравитропизме *GSLs* проявляли в основном понижение экспрессии, за исключением генов, гомологичных *ATGSL1*, *ATGSL4* и *ATGSL5*, то *GH17s* показывали весьма разнообразные профили экспрессии. Среди них выделены *BGs*, которые значительно повышали экспрессию только при гравитропизме (*LusBG1* и *LusBG3*), что предполагает активную деградацию каллозы в волокнах в ходе гравитропизма. К концу гравитропизма (через 96 ч) значения экспрессии анализируемых генов часто не просто достигали значений экспрессии в волокнах контрольных растений, а приближались к значениям более ранней стадии развития волокна.

Полученные данные могут быть использованы для исследования роли β -1,3-глюкансинтаз и β -1,3-глюканаз в растениях в норме и при гравитропизме. Но остаются вопросы о локализации каллозы и ее количественной оценке. Ответы на них предстоит получить в дальнейших исследованиях.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-24-00612.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moulia B., Fournier M. The power and control of gravitropic movements in plants: a biomechanical and systems biology view // J. Exp. Bot. 2009. V. 60. P. 461.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ern341>
2. Gorshkova T., Chernova T., Mokshina N., Ageeva M., Mikshina P. Plant “muscles”: fibers with a tertiary cell wall // New Phytol. 2018. V. 218. P. 66.
<https://doi.org/10.1111/nph.14997>

3. Almeras T., Derycke M., Jaouen G., Beauchene J., Fournier M. Functional diversity in gravitropic reaction among tropical seedlings in relation to ecological and developmental traits // J. Exp. Bot. 2009. V. 60. P. 4397.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erp276>
4. Kojima M., Becker V.K., Altaner C.M. An unusual form of reaction wood in Koromiko [*Hebe salicifolia* G. Forst. (Pennell)], a southern hemisphere angiosperm // Planta. 2012. V. 235. P. 289.
<https://doi.org/10.1007/s00425-011-1503-z>
5. Fisher J.B. Anatomy of axis contraction in seedlings from a fire prone habitat // Am. J. Bot. 2008. V. 95. P. 1337.
<https://doi.org/10.3732/ajb.0800083>
6. Schreiber N., Gierlinger N., Putz N., Fratz P., Neinhuis C., Burgert I. G-fibres in storage roots of *Trifolium pratense* (Fabaceae): tensile stress generators for contraction // Plant J. 2010. V. 61. P. 854.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04115.x>
7. Ibragimova N.N., Ageeva M.V., Gorshkova T.A. Development of gravitropic response: unusual behavior of flax phloem G-fibers // Protoplasma. 2017. V. 254. P. 749.
<https://doi.org/10.1007/s00709-016-0985-8>
8. Waterkeyn L., Caeymaex S., Decamps E. Callose in compression wood tracheids of *Pinus* and *Larix* // Bull. Soc. Roy. Bot. Belg. 1982. V. 115. P. 149.
9. Chen X.-Y., Kim J.-Y. Callose synthesis in higher plants // Plant Signal. Behav. 2009. V. 4. P. 489.
<https://doi.org/10.4161/psb.4.6.8359>
10. Usak D., Haluška S., Pleskot R. Callose synthesis at the center point of plant development – an evolutionary insight // Plant Physiol. 2023. V. 193. P. 54.
<https://doi.org/10.1093/plphys/kiad274>
11. Pirsellova B., Matusikova I. Callose: the plant cell wall polysaccharide with multiple biological functions // Acta Physiol. Plant. 2013. V. 35. P. 635.
<https://doi.org/10.1007/s11738-012-1103-y>
12. Richmond T.A., Somerville C.R. The cellulose synthase superfamily // Plant Physiol. 2000. V. 124. P. 495.
<https://doi.org/10.1104/pp.124.2.495>
13. Verma D.P.S., Hong Z. Plant callose synthase complexes // Plant Mol. Biol. 2001. V. 47. P. 693.
<https://doi.org/10.1023/A:1013679111111>
14. Lombard V., Ramulu H.G., Drula E., Coutinho P.M., Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013 // Nucleic Acids Res. 2014. V. 42. P. D490.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>
15. Perrot T., Pauly M., Ramírez V. Emerging roles of β -glucanases in plant development and adaptative responses // Plants. 2022. V. 11. P. 1119.
<https://doi.org/10.3390/plants11091119>
16. Snegireva A.V., Ageeva M.V., Amenitskii S.I., Chernova T.E., Ebskamp M., Gorshkova T.A. Intrusive growth of sclerenchyma fibers // Russ. J. Plant Physiol. 2010. V. 57. P. 342.
<https://doi.org/10.1134/S1021443710030052>
17. Gorshkova T., Chernova T., Mokshina N., Gorshkov V., Kozlova L., Gorshkov O. Transcriptome analysis of intrusively growing flax fibers isolated by laser microdissection // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 14570.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-32869-2>
18. Mokshina N., Gorshkov O., Takasaki H., Onodera H., Sakamoto S., Gorshkova T., Mitsuda N. FIBexDB: a new online transcriptome platform to analyze development of plant cellulosic fibers // New Phytol. 2021. V. 231. P. 512.
<https://doi.org/10.1111/nph.17405>
19. Cui W., Lee J.-Y. Arabidopsis callose synthases CalS1/8 regulate plasmodesmal permeability during stress // Nat. Plants. 2016. V. 2. P. 16034.
<https://doi.org/10.1038/nplants.2016.34>
20. Teea E.E., Johnstona M.G., Papp D., Faulkner C.A. PDLN-NHL3 complex integrates plasmodesmal immune signaling cascades // PNAS. 2023. V. 120. e2216397120.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2216397120>
21. Seville I., Miyashima S., Helariutta Y. Cell-to-cell communication via plasmodesmata in vascular plants // Cell Adh. Migr. 2013. V. 7. P. 27.
<https://doi.org/10.4161/cam.22126>
22. Saatian B., Kohalmi S.E., Cui Y. Localization of *Arabidopsis* Glucan Synthase-Like 5, 8, and 12 to plasmodesmata and the GSL8-dependent role of PDLN5 in regulating plasmodesmal permeability // Plant Signal. Behav. 2023. V. 18. P. 2164670.
<https://doi.org/10.1080/15592324.2022.2164670>
23. Xie B., Wang X., Zhu M., Zhang Z., Hong Z. CalS7 encodes a callose synthase responsible for callose deposition in the phloem: a phloem-specific callose synthase // Plant J. 2011. V. 65. P. 1.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04399>
24. Gorshkov O., Mokshina N., Ibragimova N., Ageeva M., Gogoleva N., Gorshkova T. Phloem fibres as motors of gravitropic behaviour of flax plants: level of transcriptome // Funct. Plant Biol. 2018. V. 45. P. 203.
<https://doi.org/10.1071/FP16348>
25. Ellinger D., Naumann M., Falter C., Zwickowicz C., Jamrow T., Manisseri C., Somerville S.C., Voigt C.A. Elevated early callose deposition results in complete penetration resistance to powdery mildew in *Arabidopsis* // Plant Physiol. 2013. V. 161. P. 1433.
<https://doi.org/10.1104/pp.112.211011>
26. Naumann M., Somerville S., Voigt C. Differences in early callose deposition during adapted and non-adapted powdery mildew infection of resistant *Arabidopsis* lines // Plant Signal. Behav. 2013. V. 8. e24408.
<https://doi.org/10.4161/psb.24408>
27. Enns L.C., Kanaoka M.M., Torii K.U., Comai L., Okada K., Cleland R.E. Two callose synthases, GSL1 and GSL5, play an essential and redundant role in plant and pollen development and in fertility // Plant Mol. Biol. 2005. V. 58. P. 333.
<https://doi.org/10.1007/s11103-005-4526-7>
28. Zhou C., Yin Y., Dam P., Xu Y. Identification of novel proteins involved in plant cell-wall synthesis based on protein-protein interaction data // J. Proteome Res.

2010. V. 9. P. 5025.
<https://doi.org/10.1021/pr100249c>
29. Sakuma Y., Maruyama K., Osakabe Y., Qin F., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression // Plant Cell. 2006. V. 18. P. 1292.
<https://doi.org/10.1105/tpc.105.035881>
30. Levy A., Erlanger M., Rosenthal M., Epel B.L. A plasmodesmata-associated beta-1,3-glucanase in Arabidopsis // Plant J. 2007. V. 49. P. 669.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02986.x>
31. Ho L.H., Giraud E., Uggalla V., Lister R., Clifton R., Glen A., Thirkettle-Watts D., Van Aken O., Whelan J. Identification of regulatory pathways controlling gene expression of stress-responsive mitochondrial proteins in Arabidopsis // Plant Physiol. 2008. V. 147. P. 1858.
<https://doi.org/10.1104/pp.108.121384>
32. Borner G.H., Lilley K.S., Stevens T.J., Dupree P. Identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in Arabidopsis. A proteomic and genomic analysis // Plant Physiol. 2003. V. 132. P. 568.
<https://doi.org/10.1104/pp.103.021170>
33. Ko J.H., Yang S.H., Park A.H., Lerouxel O., Han K.H. ANAC012, a member of the plant-specific NAC transcription factor family, negatively regulates xylary fiber development in *Arabidopsis thaliana* // Plant J. 2007. V. 50. P. 1035.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03109.x>
34. Zavaliev R., Levy A., Gera A., Epel B.L. Subcellular dynamics and role of *Arabidopsis* β -1,3-glucanases in cell-to-cell movement of tobamoviruses // Mol. Plant Microbe Interact. 2013. V. 26. P. 1016.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-03-13-0062-R>

УДК 581.1:602.6

ПОЛУЧЕНИЕ И ПЕРВИЧНАЯ ОЦЕНКА ФЕНОТИПА ТОПОЛЯ БЕРЛИНСКОГО, ТРАНСФОРМИРОВАННОГО ГЕНОМ *AtGA20ox1*

© 2024 г. В. В. Павличенко^{а, *}, М. В. Протопопова^{а, **}^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

*e-mail: vpavlichenko@gmail.com

**e-mail: marina.v.protopopova@gmail.com

Поступила в редакцию 04.11.2023 г.

После доработки 16.11.2023 г.

Принята к публикации 17.11.2023 г.

Увеличение скорости набора биомассы является одним из важнейших направлений в селекции древесных растений. Тем не менее, применение классических подходов селекции к древесным растениям существенно ограничено из-за длительных циклов размножения многих видов. Развитие технологий генетической инженерии и редактирования генома позволило проводить улучшение признаков деревьев за относительно короткое время. Объектом для генетических манипуляций, целью которых является ускорение роста растений, часто являются гены биосинтеза фитогормонов. Гиббереллин-20-оксидаза является ключевым ферментом, определяющим активное производство гиббереллинов в растениях и, следовательно, предпочтительной мишенью для генетических манипуляций, направленных на увеличение скорости роста. В данной работе представлено оригинальное исследование по получению тополя берлинского *Populus × berolinensis* K. Koch, трансформированного геном, кодирующим гиббереллин-20-оксидазу из *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (*AtGA20ox1*), и первичной оценке фенотипических эффектов проведенной трансформации. Основными фенотипическими проявлениями трансформации явились выраженное удлинение стебля за счет увеличения размера междоузлий, незначительное его истончение, а также удлинение и заужение листьев. Наши результаты показали, что гиперэкспрессия гена *AtGA20ox1* у тополя берлинского приводит к ускорению его роста как минимум в три раза в условиях *in vitro* по сравнению с контрольными значениями. Негативные эффекты трансформации, выражающиеся в слабом укоренении или высокой частоте апикальных некрозов и наблюдавшиеся у некоторых трансгенных линий на начальных этапах отбора, не проявляются у трех финально отобранных линий.

Ключевые слова: *Populus × berolinensis*, быстрорастущие растения, геном-модифицированные организмы, гиббереллины, гиббереллин-20-оксидаза, тополь, трансгенные древесные растения, продуктивность растений, фитогормоны

DOI: 10.31857/S0015330324020092, EDN: OAWLUE

ВВЕДЕНИЕ

Гиббереллины — это класс фитогормонов, которые стимулируют рост и запускают различные процессы развития в течение всего жизненного цикла растения, включая прорастание семян, удлинение стебля, определение пола, цветение, формирование плодов и старение [1]. У высших растений ключевые пути биосинтеза гиббереллинов катализируются тремя основными ферментами: гиббереллин-20-оксидаза, гиббереллин-3-оксидаза и гиббереллин-2-оксидаза. Первые два фермента вовлечены в реакции по формированию биоактивных форм гиббереллинов, в то время как гиббереллин-2-оксидаза инактивирует их непосредственных предшественников. За биосинтез главного пред-

шественника гиббереллинов отвечает не менее важный фермент энт-каурен-синтаза [2]. С момента открытия роли и функции гена *GA20ox*, кодирующего гиббереллин-20-оксидазу [3], интерес к его использованию для управления продуктивностью растений не снижается. Рядом научных коллективов были предприняты попытки увеличить скорость роста различных растений путем трансгенеза и гиперэкспрессии гена *GA20ox*. В литературе описаны эксперименты по генетической трансформации древесных растений геном *GA20ox*, в целом приводящие к основному фенотипическому эффекту — увеличению скорости роста [4–10]. Помимо увеличения скорости роста, показано, что трансформация геном *GA20ox*, может приводить и к проявлению

негативных плейотропных эффектов. Так для растений *P. tremula* × *P. tremuloides*, трансгенных по *AtGA20ox1*, кроме двукратного увеличения скорости роста отмечено истончение междоузлий и плохое укоренение [9]. При цисгенной трансформации цитрусового гибрида цитранжа Карризо (*Citrus sinensis* L. Osbeck × *Poncirus trifoliata* L. Raf.) геном *CcGA20ox1*, помимо стандартных эффектов в виде удлинения ветвей и междоузлий, ускоренного роста, приводящего к формированию вытянутого фенотипа, и уменьшения площади листьев, авторы также отмечали и вполне очевидные негативные проявления, такие как слабое укоренение и снижение биомассы [10]. Несмотря на наличие задокументированных трансформаций, коммерчески успешных генотипов древесных пород до сих пор не создано. Объяснений этому может быть множество, начиная от ложноположительной детекции трансгенеза с последующим изучением соматоклональной изменчивости, заканчивая такими сложными явлениями как эффект положения гена, видоспецифичность экспрессии трансгена, сайленсинг или химеризм растения.

Высокопродуктивные трансгенные деревья создаются в основном для плантационного выращивания с целью увеличения базы растительного сырья. Одними из наиболее подходящих культур для такого рода возделывания являются представители рода *Populus*. Тополя относятся к наиболее быстрорастущим видам древесных растений и достигают минимально необходимых размеров для использования уже через 4–5 лет после высадки в грунт. Древесина тополей обладает ценными свойствами, определяющими возможность ее широкого использования в различных областях промышленности. Она характеризуется высоким содержанием целлюлозы относительно лигнина, что делает ее ценным сырьем для производства как древесных полуфабрикатов различной степени очистки, так и чистых продуктов (целлюлоза, этиловый спирт). Пластичность древесины тополя определяет ее широкое использование в производстве строительных материалов и изготовлении мебели. Высокие экологические показатели сжигания древесины тополя делают ее перспективным сырьем при производстве различных видов биотоплива.

Важным параметром при выборе деревьев для создания высокопродуктивных плантаций является форма их кроны. Растения с раскидистой кроной требуют больше места для посадки, в отличие от деревьев с колоновидной или веретеновидной кроной, которые можно высаживать довольно плотно и тем самым получать больше биомассы с единицы площади. Одним из перспективных видов деревьев для плантационного выращивания является тополь берлинский *Populus* × *berolinensis* K. Koch. Обладая высокой

скоростью роста и узкой веретеновидной кроной, данный вид способен формировать лесопосадку с плотностью до 1 дерева на квадратный метр. Увеличение продуктивности таких деревьев методами генетической инженерии позволит еще более эффективно использовать полезные свойства этого вида для получения и глубокой переработки его древесины (биорефайнинга). Кроме того, трансгенные деревья с измененным биосинтезом гиббереллинов могут стать модельным объектом для более глубокого изучения путей их биосинтеза у древесных растений.

Настоящее исследование было направлено на создание тополя берлинского, трансгенного по гену *AtGA20ox1*, и на оценку полученных фенотипических эффектов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. В качестве объекта для генетической трансформации был выбран тополь берлинский (*Populus* × *berolinensis* K. Koch) — гибрид тополя лавроволистного (*P. laurifolia* Ledeb.) и тополя черного (*P. nigra* L.). В работе использовали *in vitro* культуру *Populus* × *berolinensis*, созданную и культивируемую авторами в СИФИБР СО РАН. Данный вид быстро растет в культуре *in vitro*, легко размножается путем срезания и укоренения верхушечной части растения, а также дает большое количество боковых побегов, которые активно образуются после срезания апикальной меристемы. В культуре *in vitro* укоренение побегов после срезания близка к 100%. Источником донорной ДНК послужил *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (экотип Columbia).

Подготовка питательных сред. Для культивирования растений тополя использовали твердую питательную среду на основе смеси базовых солей классической среды Мурасиге-Скуга (МС-среда) [11] с добавлением тиамина (1 мг/л), пиридоксина (0.5 мг/л), никотиновой кислоты (0.5 мг/л), мезо-инозита (50 мг/л) и агара (7 г/л). В качестве источника углеводов использовали сахарозу (2% для укоренения и 3% для ко-культивирования растительных эксплантов с агробактериями и регенерации растений после трансформации). Кислотность среды доводили до pH 5.7. Питательную среду стерилизовали в автоклаве в течение 15 мин при температуре 121°C и давлении 220 кПа, остужали до 50°C и разливали по 10 мл в стерильные пробирки Z681784 (“Sigma-Aldrich”, Германия) размером 25 × 150 мм и/или 25 × 200 мм (Китай) с вентилируемыми крышками C5791 (“Sigma-Aldrich”, Германия) или по 50 мл в сосуды для культуры тканей растений Magenta vessel GA-7-3 (“Merck”, Германия).

Для укоренения и получения регенерантов использовали 6-бензиламинопурин (БАП), тидиазурон (ТДЗ), 1-нафталинуксусную кислоту

(НУК) и индолил-3-масляную кислоту (ИМК) в различных концентрациях (информация приведена ниже).

In vitro культура тополя берлинского. Для микрклонального размножения тополя берлинского применяли подход по укоренению срезанной верхушечной части растения и/или адвентивных побегов, образывавшихся после удаления апикальной меристемы. Укоренение растений, использованных для последующей агробактериальной трансформации, производили в вышеописанной питательной МС-среде с добавлением ИМК (0.15 мг/л). После трансформации укоренение контрольной группы и отобранных трансгенных линий проводили без добавления ИМК в питательную среду. Содержание растений тополя *in vitro* на всех этапах проводили в климатической комнате при 24°C с фотопериодом 16/8 ч (день/ночь) и освещенностью 5000 лк. В качестве источников света использовали флуоресцентные лампы TL5 HE 28W/865 (“ВМС”, Китай) [12].

Выделение РНК, очистка мРНК и синтез кДНК. Свежие листья и цветочес А. *thaliana* (150 мг) измельчали в 700 мкл реагента TRIzol (“Invitrogen”, США) на гомогенизаторе Minilys (“Bertin Instruments”, Франция). Из полученного гомогената выделяли суммарную РНК методом гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции [13]. Для эффективного разделения органической и водной фаз использовали гель MaXtract (“Qiagen”, Германия). Препарат суммарной РНК обрабатывали ДНКазой I (“Thermo Fisher Scientific”, США) и использовали для очистки мРНК набором Oligotex mRNA Mini Kit (“Qiagen”, Германия). С 1 мкг мРНК синтезировали кДНК с помощью обратной транскриптазы RevertAid H Minus и праймера oligo(dT)₁₈ (“Thermo Fisher Scientific”, США).

Дизайн праймеров для амплификации гена AtGA20ox1. Дизайн праймеров для амплификации целевого гена осуществляли на основе последовательности мРНК *AtGA20ox1* (NM_118674.4 – GenBank, AT4G25420.1 – TAIR). В последовательности праймеров вносили изменения таким образом, чтобы они содержали сайты рестрикции, соответствующие сайтам в векторной плазмиде pBI121. Прямой праймер (Ox20_BamHI_F) был комплементарен 5'-UTR мРНК *AtGA20ox1* и началу ее кодирующей области, включая старт-кодон. Внесенные изменения формировали сайт рестрикции BamHI: 5'-СТАТААТGGATCCAAATGGCCGTAAG-3'. Обратный праймер (Ox20_SacI_R) соответствовал фрагменту, совмещающему короткий участок 3'-UTR мРНК *AtGA20ox1* и конец кодирующей области, включая стоп-кодон. Внесенные изменения формировали сайт рестрикции SacI: 5'-ТАТТТGAGCTCTTAGATGGGTTTGG-3'.

Серым цветом в праймерах выделены триплеты, соответствующие старт- (ATG) и стоп- (TAA) кодонам, жирным шрифтом – позиции с внесенными изменениями, подчеркиванием – последовательность вновь образованного сайта рестрикции.

Векторные системы. Для промежуточного ТА клонирования ампликонов *AtGA20ox1* использовали вектор pTZ57R/T (“Fermentas”, Германия), содержащий селективный ген *bla*, обеспечивающий устойчивость к ампициллину, ген *lacZ* для проведения бело-голубого скрининга бактериальных колоний, и сайты посадки стандартных праймеров M13.

В качестве бинарной векторной системы для агробактериальной трансформации использовали pBI121 с хелперной Ti плазмидой pMP90. Для проведения субклонирования использовали вектор *uidA*/pBI121 [14], содержащий селективный ген *nptII*, обеспечивающий устойчивость к канамицину, и репортерный ген *uidA*, кодирующий бета-глюкуронидазу и находящийся под контролем CaMV 35S промотора.

Получение промежуточных векторных конструкций и трансформация клеток Escherichia coli. Амплификацию кодирующей последовательности гена *AtGA20ox1* проводили в термоциклере T100 (“Bio-Rad”, США) в объеме смеси 20 мкл с использованием пары праймеров O×20_BamHI_F + O×20_SacI_R (табл. 1) с финальной концентрацией каждого из них 250 нМ, 0.5 Е ДНК-полимеразы GoTaq® Flexi (“Promega”, США), 1× буфера GoTaqFlexi, 2.5 мМ MgCl₂, 250 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата и 2 мкл матрицы кДНК (разбавленной в 10 раз). Первичную денатурацию осуществляли при 95°C в течение 5 мин, после которой следовало 35 циклов: 30 с при 95°C; 30 с при 55°C; 1 мин 20 с при 72°C. Финальную элонгацию проводили при 72°C в течение 4 мин. В целях проверки отсутствия ДНК-контаминации проводили отрицательный (без ДНК) контроль ПЦР.

Продукты амплификации разделяли в 1.5% агарозном геле и визуализировали с помощью бромистого этидия и системы гель-документирования Gel Doc XR+ (“Bio-Rad”, США). Целевой ПЦР продукт, соответствующий ожидаемой длине, вырезали, очищали от агарозного геля с помощью набора GeneJET Gel Extraction Kit (“Thermo Fisher Scientific”, Литва) и лигировали с промежуточным плазмидным вектором pTZ57R/T (“Fermentas”, Германия). Клонирование конструкции *AtGA20ox1*/pTZ57R/T проводили в клетках *E. coli* путем трансформации химически компетентных клеток (TOP10 Competent Cells, “Invitrogen”, США) методом теплового шока. Отобранные на селективной среде с ампициллином (100 мг/л) и с использованием бело-голубого скрининга колонии, получившие

Таблица 1. Характеристика праймеров, использованных в работе

Название	Специфичность связывания	Нуклеотидная последовательность праймера (5'–3')	Температура отжига, °C	Ампликон, п.о.
nptII_F	<i>nptII</i>	TGGAGAGGCTATTCGGCTATGA	55	372
nptII_R		GATGTTTTCGCTTGGTGGTCG	55	
Ox20_BamHI_F	<i>AtGA20ox1</i> (кДНК)	CTATAATGGATCCAAATGGCCGTAAG	55	1160
Ox20_SacI_R		TATTTGAGCTCTTAGATGGGTTTGG	55	
Ox20_insert_F	<i>AtGA20ox1</i>	TTCTTTGATATGCCTCTCTCCGA	55	428
Ox20_insert_R		TGAAGGATGGTAAGAGATGTTGGAT	55	
M13_F	pTZ57R/T и pBI121	GTAAAACGACGGCCAG	55	1316 (pTZ57R/T)
M13_R		CAGGAAACAGCTATGAC	55	
p35_F	pBI121	CCATTGCCCAGCTATCTGTCACT	55	1615
TNOS_R		CCCATCTCATAAATAACGTCATGCA	55	

встройку, дополнительно верифицировали при помощи бактериального ПЦР с добавлением пары стандартных праймеров M13_F + M13_R (табл. 1), специфичных к фланкирующим встройку сайтам вектора. ПЦР проводили как описано выше с использованием бактериальных колоний в качестве источника ДНК-матрицы и временем элонгации 1.5 мин. Колонии, для которых была показана амплификация продуктов ожидаемой длины, были использованы для дальнейшего анализа. Материал с колоний инокулировали в 5 мл жидкой среды LB с ампициллином и инкубировали в течение 16–18 ч при температуре 37°C. Из полученной бактериальной культуры выделяли плазмиды с помощью набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (“Thermo Fisher Scientific”, Литва).

Получение векторной конструкции *AtGA20ox1/pBI121* и агробактериального клона на его основе. С векторной конструкцией *AtGA20ox1/pTZ57R/T*, полученной на предыдущем этапе, и исходной *uidA/pBI121* были проведены реакции двойной рестрикции по сайтам BamHI и SacI с использованием соответствующих ферментов (“Thermo Fisher Scientific”, США) согласно протоколу фирмы-производителя. Линеаризованные pBI121 и *AtGA20ox1*, фланкированные липкими концами BamHI и SacI, были электрофоретически отделены от нецелевых фрагментов рестрикции в 1.5% агарозном геле и очищены из геля с помощью набора реагентов GeneJET Gel Extraction Kit (“Thermo Fisher Scientific”, Литва). Очищенные целевые фрагменты были лигированы с использованием T4 ДНК-лигазы (“Thermo Fisher Scientific”, США) для получения целевого рекомбинантного вектора *AtGA20ox1/pBI121*. Полученный вектор *AtGA20ox1/pBI121* использовали для трансформации клеток

E. coli как описано выше. Отбор целевых колоний осуществляли на селективной среде LB с добавлением канамицина (50 мг/л) и в ходе дальнейшего ПЦР-скрининга с использованием праймеров M13_F + M13_R. Колония *E. coli* с верифицированной вставкой была использована для клонирования целевой векторной конструкции описанным выше способом. Плазмидную ДНК выделяли из бактериальной культуры, полученной на основе целевого клона *E. coli*, и дополнительно проверяли методом ПЦР на наличие целевой вставки. Реакцию осуществляли по вышеописанной методике с праймерами p35_F + TNOS_R (табл. 1), комплементарными соответственно промотору и терминатору плазмиды pBI121 (рис. 1а).

Плазмидную ДНК, содержащую целевую вставку, использовали для трансформации компетентных клеток *Agrobacterium tumefaciens* (штамм C58C1 с резистентностью к рифампицину). Трансформацию осуществляли классическим методом замораживания–оттаивания [15] с авторскими модификациями. К 100 мкл растаявшей на льду суспензии компетентных клеток добавляли 200 нг целевого вектора *AtGA20ox1/pBI121* и инкубировали 5 мин при 4°C. Затем пробирку с бактериальной суспензией помещали на плавающий коврик и замораживали в жидком азоте в течение 5 мин, после чего оттаивали при комнатной температуре в течение 10 мин. К полученной суспензии добавляли 1.5 мл питательной среды YEB без антибиотиков и культивировали 4 ч при 28°C в шейкере инкубаторе Incubator 1000 (“Heidolph”, Германия) при 220 об/мин. Подросшую культуру осаждали на микроцентрифуге в течение 5 мин при 8000 об/мин. Полученный

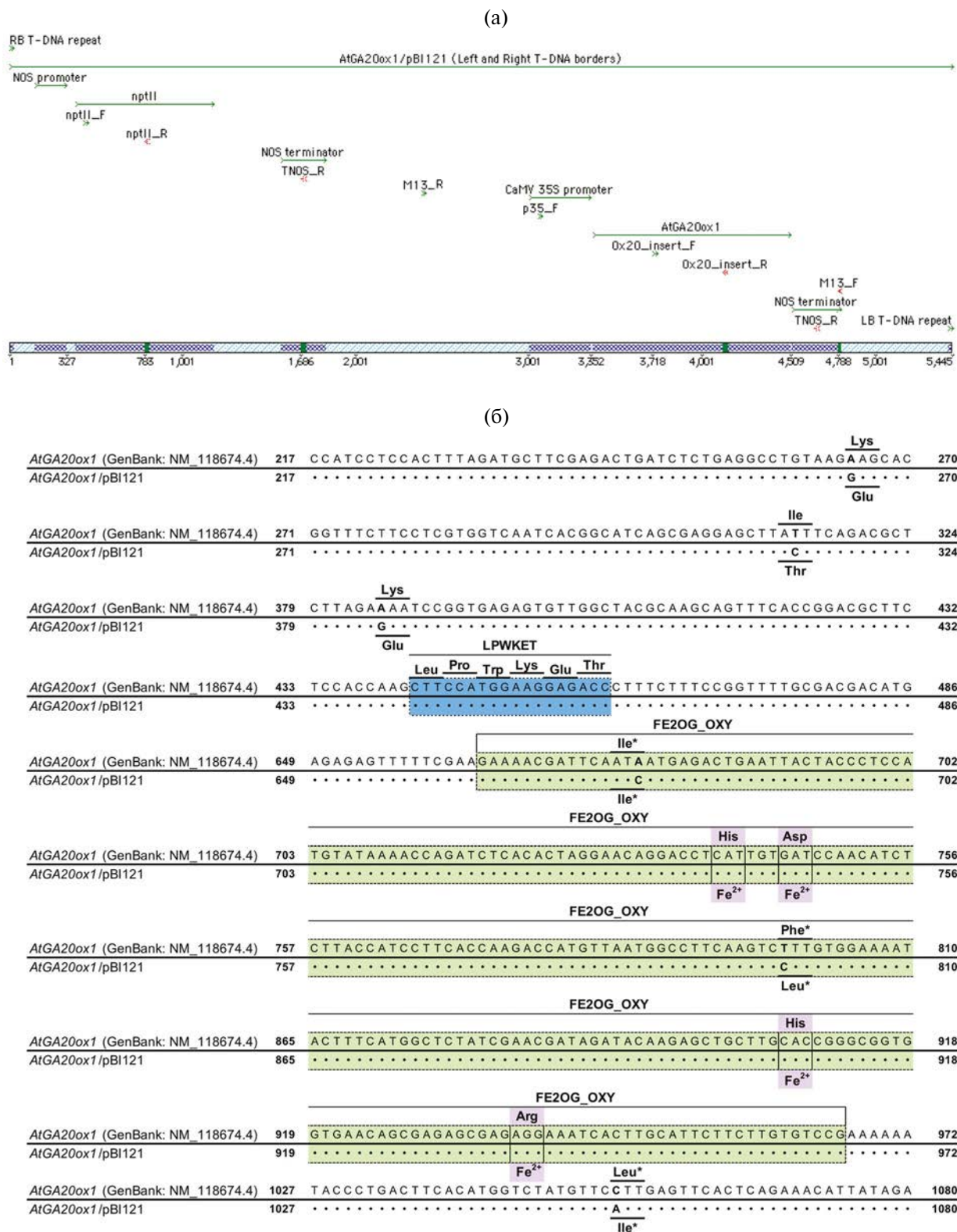


Рис. 1. (а) – Основные элементы и сайты посадки праймеров на участке *AtGA20ox1*/pBI121 между левой и правой границами Т-ДНК; (б) – Участки выравнивания (общая длина – 1134 п.н.) кодирующих последовательностей гена *AtGA20ox1*: верхняя – референтная (GenBank NM_118674.4), нижняя – использованная в текущей работе. Точками обозначены позиции, совпадающие с референтом, жирным шрифтом обозначены нуклеотидные замены, цифры указывают на позиции в нуклеотидном выравнивании. Звездочка указывает на синонимичные замены или на аминокислотные замены, не связанные с изменением характера полярности боковых радикалов. LPWKET (синий) – сайт связывания субстрата [18, 19]; FE2OG_OXY (зеленый) – Fe²⁺-2-оксоглутарат зависимый диоксигеназный каталитический домен; Fe²⁺ (фиолетовый) – предположительные сайты связывания соответствующих ионов (по данным ScanProsite).

супернатант сливали и осадок растворяли в 200 мкл YEB с рифампицином (50 мг/л). Весь объем бактериальной суспензии распределяли на чашку Петри с твердой средой YEB с рифампицином (50 мг/л) и канамицином (50 мг/л). Чашку инкубировали в воздушном термостате при 28°C в течение 2 сут. Полученные колонии скринировали методом ПЦР с использованием праймеров p35_F + TNOS_R. Агробактериальную колонию, для которой был отмечен положительный результат ПЦР, использовали для создания глицеринового бактериального стока для длительного хранения при –80°C.

Секвенирование по методу Сэнгера и анализ нуклеотидных последовательностей. Для подтверждения соответствия целевой последовательности гену *AtGA20ox1* во всех полученных генетических конструкциях проводили их секвенирование по методу Сэнгера. Реакцию терминирования осуществляли с использованием набора реактивов BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v. 3.1 (“Applied Biosystems”, США) согласно оригинальному протоколу с использованием праймеров M13_F + M13_R (для *AtGA20ox1/pTZ57R/T*) и OX20_insert_F + OX20_insert_R (для *AtGA20ox1/pBI121*) (рис. 1а; табл. 1). Продукты реакции очищали в соответствии с методикой фирмы-производителя с использованием ЭДТА и этилового спирта, разделяли при помощи капиллярного электрофореза на автоматическом генетическом анализаторе серии 3500 (“Applied Biosystems”, Япония). Соответствие нуклеотидной последовательности гену *AtGA20ox1* подтверждали с помощью онлайн инструмента Nucleotide BLAST на платформе NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Для определения однонуклеотидного полиморфизма полученные последовательности выравнивали и сопоставляли с референтом (GenBank NM_118674.4) в программе MEGA v. 6.06. с помощью алгоритма MUSCLE на стандартных настройках (рис. 1б). Определение предположительной доменной структуры белка проводили с помощью инструмента ScanProsite на онлайн платформе PROSITE (<https://prosite.expasy.org/>).

Агробактериальная трансформация и отбор регенерантов. Для агробактериальной генетической трансформации использовали отрезки стеблей без пазушных почек *in vitro* растений тополя берлинского. Совместное культивирование эксплантов и агробактерии проводили в 4 культуральных сосудах Magenta vessel GA-7-3 (“Merck”, Германия), в которые помещали по 100 отрезков стеблей. На каждый отрезок стебля наносили по 10 мкл суспензии агробактерии, которую предварительно выращивали в 6 мл жидкой среды YEB с канамицином (50 мг/л) и рифампицином (50 мг/л) в течение 24 ч. Перед нанесением на растительный эксплант 2 мл агробактериальной куль-

туры осаждали центрифугированием в течение 2 мин при 8000 об/мин и ресуспендировали в 1.8 мл свежей YEB без антибиотика. Для трансформации использовали бактериальную суспензию с OD₆₀₀ = 0.9–1.1. Совместное культивирование растительных эксплантов с агробактериальной культурой проводили в течение 24 ч при 26°C в темноте. Параллельно проводили контрольный эксперимент, в котором растительные экспланты в количестве 32 отрезков помещали в те же условия что и экспериментальные, но бактериальную суспензию заменяли на стерильную среду YEB без антибиотика. После ко-культивации экспланты переносили на свежую питательную МС-среду, содержащую гормоны для прямого морфогенеза БАП (0.2 мг/л), ТДЗ (0.02 мг/л) и НУК (0.01 мг/л), а также антибиотики канамицин (50 мг/л) и цефотаксим (250 мг/л) для селективного отбора трансформантов и подавления роста агробактерии соответственно. Из экспериментальных контейнеров экспланты распределяли по 16 культуральным сосудам из расчета по 25 шт. на сосуд. Контрольную группу делили на 2 части и переносили в новые сосуды: 1 – без добавления антибиотиков для контроля регенерации; 2 – с добавлением канамицина (50 мг/л) и цефотаксима (250 мг/л) для контроля подавления регенерации (рис. 2б). Перенос эксплантов на питательные среды с такими же составами производили 3 раза через каждые 20 дней до появления первых регенерантов (рис. 2б). Появившиеся регенеранты переносили на питательную среду, содержащую помимо ИМК (0.15 мг/л) и цефотаксима (250 мг/л). Культивирование регенерантов в присутствии цефотаксима проводили в течение 3 пассажей. Для подтверждения отсутствия агробактериальной контаминации у полученных регенерантов проводили экспонирование их листовых эксплантов на чашках Петри со средой YEB без антибиотиков, а также содержали и размножали сами отобранные регенеранты на питательной среде без антибиотиков.

Скрининг трансгенных линий методом ПЦР. Для проведения скрининга с полученных регенерантов *in vitro* отбирали свежие листья (около 10 мг сырого веса) с использованием одноразовых стерильных пластиковых пинцетов для избежание кросс-контаминации ДНК. Отбранные листья помещали в пробирку объемом 2 мл из полипропилена высокой плотности с винтовой крышкой и уплотнительным кольцом, предотвращающим вытекание образца и возможную кросс-контаминацию. В пробирку помещали два шарика (3 и 5 мм) из нержавеющей стали, после чего образцы замораживали и хранили при –80°C до последующего проведения анализа. Измельчение образцов проводили на автоматическом гомогенизаторе Minilys (“Bertin Instruments”, Франция) в течение 2 мин

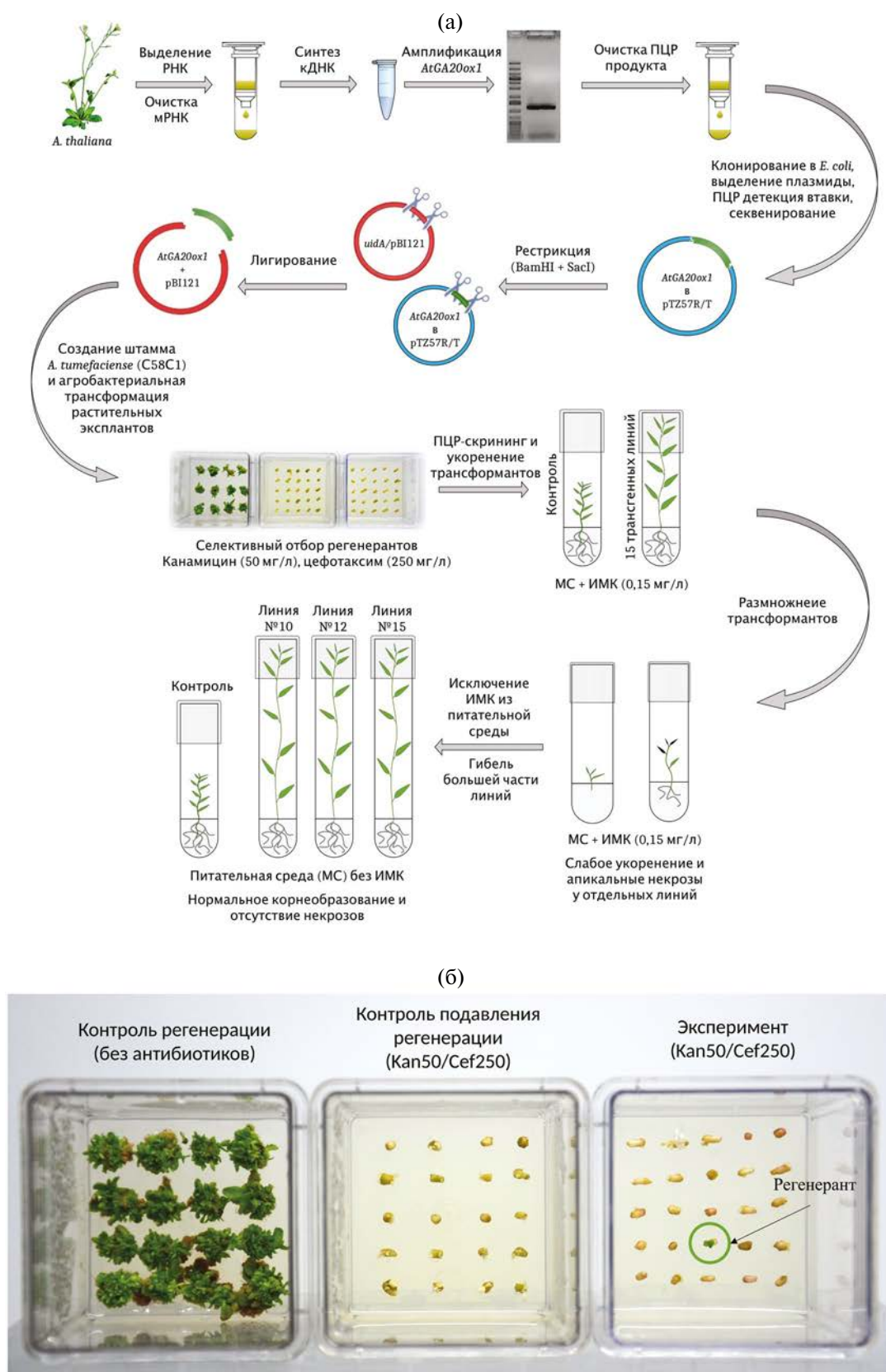


Рис. 2. (а) — Общая схема эксперимента; (б) — Регенерация растений тополя берлинского с контрольных эксплантов и после агробактериальной трансформации. Стрелкой отмечен регенерант, полученный в результате селективного отбора в присутствии антибиотиков: Kan — канамицина (50 мг/л) и Cef — цефотаксима (250 мг/л).

при 3000 об/мин. Выделение суммарной ДНК проводили классическим методом с использованием буфера на основе ЦТАБ [16] с авторскими дополнениями [17]. Отсутствие кросс-контаминации контролировали путем внесения контрольных образцов в каждую процедуру выделения геномной ДНК из растений.

Амплификацию проводили с использованием ДНК-полимеразы GoTaq Flexi ("Promega", США) и следующих пар праймеров (рис. 1а; табл. 1): 1 – *nptII_F* + *nptII_R*, специфичных к селективному гену *nptII* векторной плазмиды pBI121; 2 – *Ox20_insert_F* + *Ox20_insert_R*, специфичных к внутреннему участку гена *AtGA20ox1*; 3 – *p35_F* + *TNOS_R*, специфичных к 5'-области 35S промотора и центральному участку NOS терминатора соответственно; 4 – *nptII_F* + *M13_F* (последний работает как обратный – см. рис. 1а), специфичных соответственно к гену *nptII* и участку плазмиды pBI121, расположенному вниз по течению от NOS терминатора, фланкирующего ген *AtGA20ox1*. Отсутствие ДНК-контаминации ПЦР определяли отрицательным контролем. Общая схема эксперимента представлена на рис. 2а.

РЕЗУЛЬТАТЫ

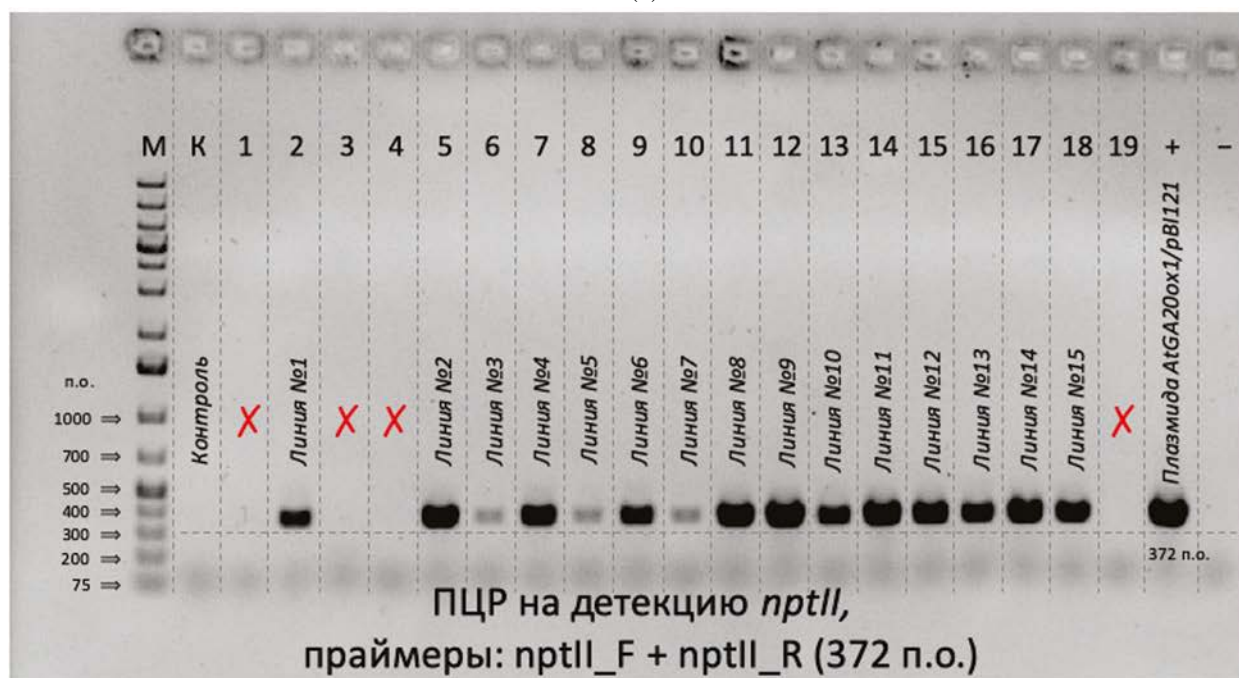
Анализ целевой рекомбинантной векторной конструкции. В результате проведенной генно-инженерной работы была создана генетическая векторная конструкция *AtGA20ox1/pBI121*. Основные элементы данной конструкции представлены на рис. 1а. Секвенирование полученной конструкции выявило шесть однонуклеотидных замен в последовательности амплифицированного гена *AtGA20ox1* по сравнению с референтом из GenBank (рис. 1б). В нуклеотидной последовательности, соответствующей предположительному сайту связывания субстрата LPWKET [18, 19], замен обнаружено не было. На участке нуклеотидной последовательности, кодирующей 2-оксоглутарат зависимый диоксигеназный каталитический домен, было выявлено две замены, одна из которых оказалась синонимичной, а вторая не приводила к изменению характера полярности бокового радикала аминокислоты, включаемой в полипептидную цепь. Предположительные сайты связывания ионов Fe^{2+} заменами затронуты не были.

Отбор трансформантов тополя берлинского. В ходе селективного отбора регенерантов (рис. 2б) на питательной среде, содержащей канамицин (50 мг/л), было отобрано 19 регенерантов тополя берлинского. Учитывая, что для трансформации было использовано 400 стеблевых эксплантов, эффективность трансформации составила около 5%. Все 19 регенерантов были перенесены на питательную среду, содер-

жащую ИМК (0.15 мг/л) для удлинения и последующего укоренения. После достижения возраста двух недель с каждого регенеранта было отобрано по одному листу для дальнейшего проведения скрининга методом ПЦР на наличие целевой вставки. Результаты ПЦР со специфичными праймерами к *nptII* и *AtGA20ox1* показали, что из 19 отобранных регенерантов только 15 содержали оба исследуемых гена. Еще у двух образцов было подтверждено наличие только *AtGA20ox1*, но не *nptII*, у двух оставшихся растений последовательности исследуемых генов обнаружены не были (рис. 3). Регенеранты, не получившие целевой и селективный гены, далее не размножали. Наличие целевого гена и сохранение его активности у отобранных 15 линий тополя дополнительно подтверждалось их выраженным удлиненным фенотипом по сравнению с контрольными растениями (рис. 4). Кроме того, все отобранные регенеранты были способны укореняться в присутствии канамицина (25 мг/л) в питательной среде, что подтверждает сохранение активности гена *nptII*. У контрольных растений при их выращивании на среде с указанной концентрацией канамицина укоренения не происходило. Следует отметить, что при культивировании трансгенных линий одним из лимитирующих факторов для работы оказалась недостаточная длина пробирок. Трансгены по сравнению с контрольными растениями слишком быстро достигали пробки и упирались в нее, что осложняло проведение сравнительных наблюдений за скоростью роста и особенностями их развития (рис. 4).

Размножение трансгенных линий тополя берлинского. Для проведения дальнейших экспериментов по изучению эффектов, вызванных генетической трансформацией тополя геном *AtGA20ox1*, необходимо было размножить полученные трансгенные линии в достаточном количестве. Обычным подходом по размножению древесных растений *in vitro* является последовательное срезание и укоренение верхней части главного побега, а также использование адвентивных побегов, отрастающих после удаления апикальной меристемы. Согласно отработанной нами методике укоренение срезанных растений производили в питательной среде, содержащей ИМК в концентрации 0.15 мг/л. Уже после первых попыток размножения полученных трансгенных линий были отмечены апикальные некротические явления, проявляющиеся на разных стадиях микроклонирования. Так, у растений линий с № 1 по № 7 часто отмечали некрозы апикальной меристемы сразу после укоренения срезанной верхней части побега (рис. 5а). Срезанные побеги линии № 8 укоренялись, но с довольно низкой эффективностью (около 50%). У клонов этой линии часто наблю-

(a)



(б)

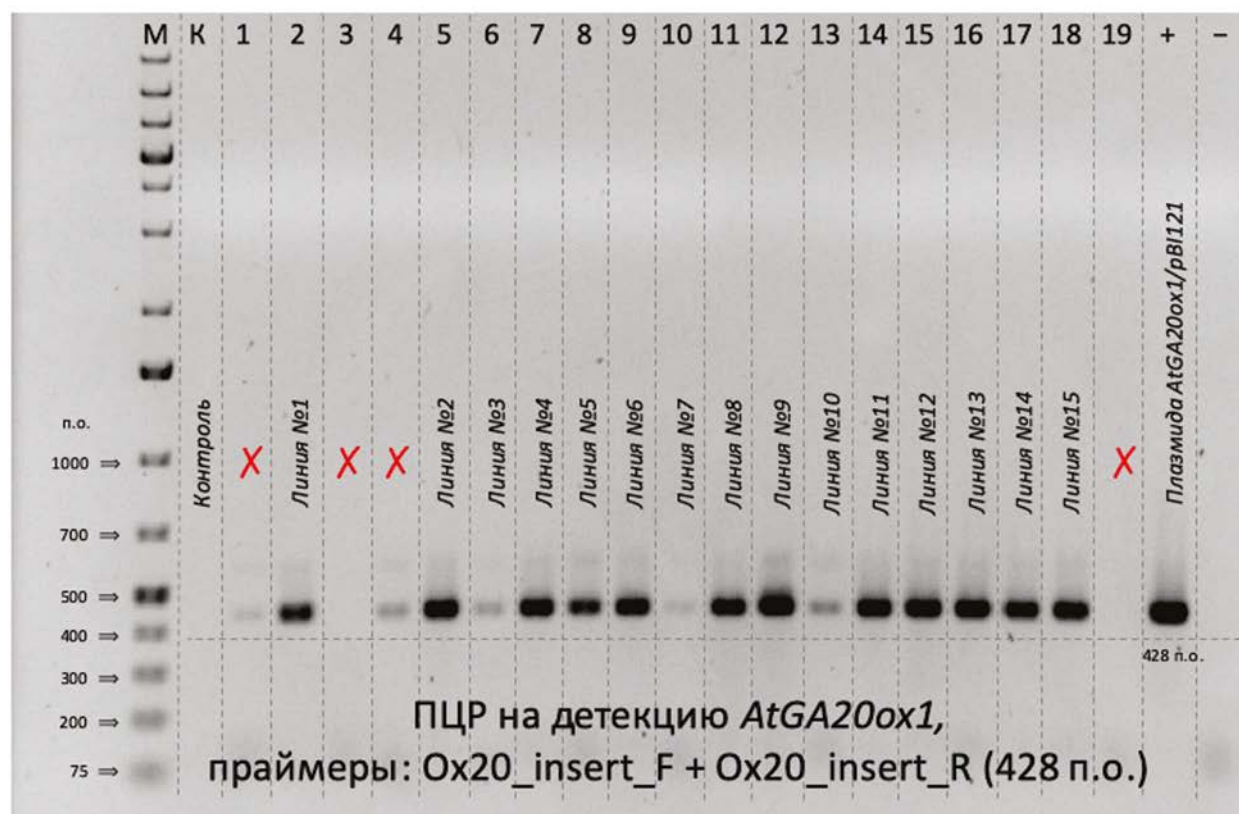


Рис. 3. ПЦР-скрининг 19 линий регенерантов тополя берлинского на присутствие генов *nptII* (а) и *AtGA20ox1* (б). М – размерный стандарт GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (“ThermoFisher Scientific”, США), К – ДНК из контрольного растения, “+” – положительный контроль ПЦР (*AtGA20ox1/pBI121*), “–” – отрицательный контроль ПЦР (без ДНК), X – линии регенерантов, исключенные из дальнейшего анализа.



Рис. 4. Сравнение трансгенных линий тополя берлинского (*AtGA20ox*) с контрольными растениями (WT) после 2 мес. роста на среде с ИМК (0.15 мг/л). Линия № 6 была повреждена при микроклональном размножении и утеряна. Высота пробирок 15 см.

дали некрозы апикальной части без укоренения (рис. 5б). Для некоторых других линий трансгенов также наблюдали некрозы апикальной части, но уже после укоренения и 30 дней роста (рис. 5в). Нами было сделано предположение, что ИМК, содержащаяся в питательной среде, может вносить свой дополнительный вклад в уже измененный гормональный статус трансгенных растений и вызывать некротические проявления. Дальнейшее культивирование растений на среде без ИМК привело к значительному сокращению количества некротических явлений. Однако размножить большинство трансгенных линий с высокой эффективностью оказалось невозможным ввиду низкого процента укоренения. Только три трансгенные линии №№ 10, 12 и 15 (рис. 6) продемонстрировали процент укореняемости, сравнимый с контрольными значениями (близкими к 100%).

ПЦР анализ трансгенных линий тополя берлинского на присутствие полнотекстовых генов исходной генетической кассеты. В связи с низкой эффективностью размножения некоторых полученных трансгенных линий *in vitro* была проведена проверка на наличие у них полнотекстовой последовательности целевого гена, а также сохранность регуляторных элементов в кассете. Была проведена ПЦР с использованием ДНК всех 19 первоначально отобранных регенерантов с целью амплификации участка, включающего 5'-область 35S промотора, последовательность гена *AtGA20ox1* целиком и область NOS терминатора (праймеры p35_F + TNOS_R). Результаты ПЦР подтвердили наличие целевой вставки у линий №№ 10, 12 и 15, а также еще у 8 линий (рис. 7а). В то же время уровень сигнала полученных ампликонов на электрофореграмме для некоторых клонов был очень слабым, близким к нижнему порогу детекции. Уровень сигнала у линий №№ 10, 12 и 15 был высоким. К моменту проведения ПЦР-анализа часть трансгенных линий была уже утрачена, или же они были

представлены единичными экземплярами из-за низкой эффективности их микроклонального размножения. Основываясь на полученных результатах, а также на эффективности размножения, для дальнейшей работы и создания лабораторной культуры были отобраны линии №№ 10, 12 и 15. Несмотря на то что трансгенная природа отобранных трех линий не вызвала сомнений, для них была проведена дополнительная ПЦР с парой праймеров *nptII_F* + *M13_F* для подтверждения наличия у них полной генетической кассеты, включающей гены *AtGA20ox1* и *nptII*, а также контролирующие их регуляторные области. Результаты показали наличие целевой полнотекстовой вставки (4373 п.о.) в геноме всех трех трансгенных линий (рис. 7б). Результаты секвенирования всех полученных ампликонов показали их соответствие целевым генам.

Фенотипические эффекты, вызванные генетической трансформацией тополя берлинского геном *ATGA20ox1*. Полученные трансгенные растения тополя берлинского отличались выраженным фенотипом, проявившимся в более длинных междоузлиях, тонком стебле, более узких листьях по сравнению с контрольными растениями (рис. 4, 6). При этом длина стеблей 60-дневных растений с момента их укоренения у трансгенных линий превышала таковую у контрольных как минимум в 3 раза. Заметных различий в скорости роста между тремя отобранными трансгенными линиями не наблюдали. Выявленный удлиненный фенотип трансгенных растений был связан с удлинением междоузлий, но не с увеличением их количества. Следует отметить, что толщина стебля у трансгенных линий увеличивалась не пропорционально его удлинению, поэтому растения, извлеченные из пробирок, не могли поддерживать вертикальное положение и были склонны к полеганию. Все описанные фенотипические проявления были стабильны в культуре *in vitro* и сохранились до текущего момен-

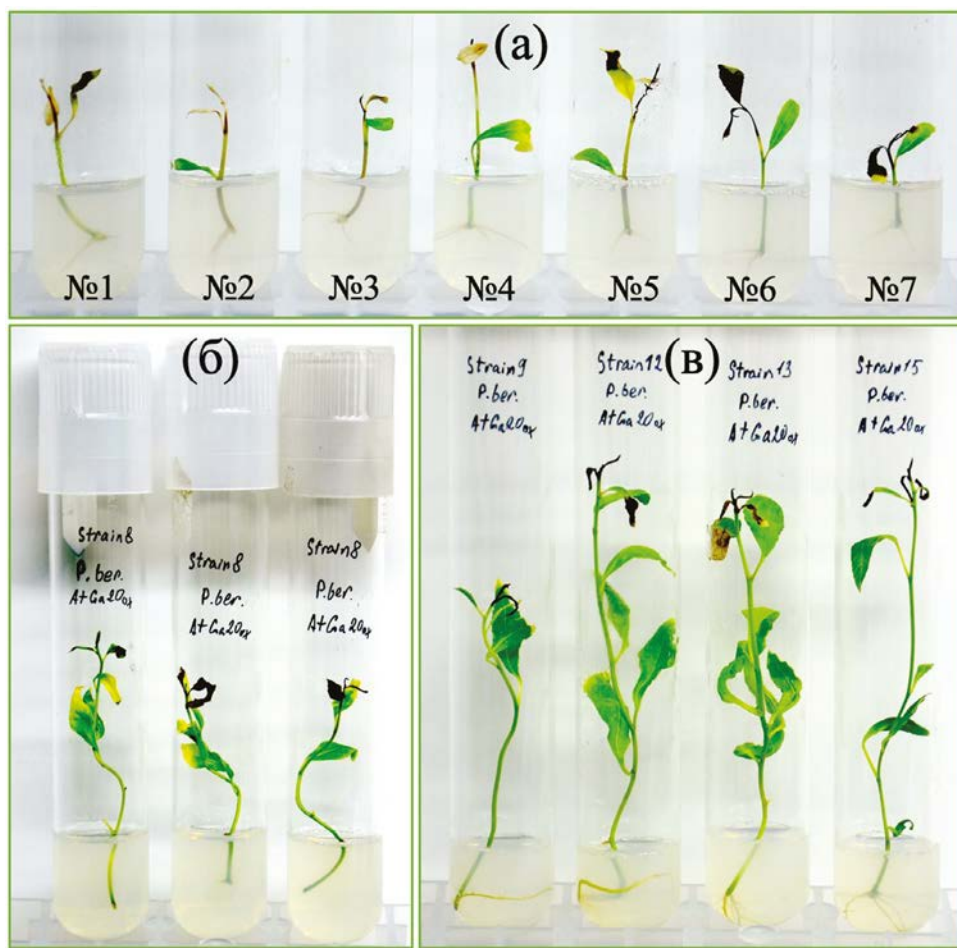
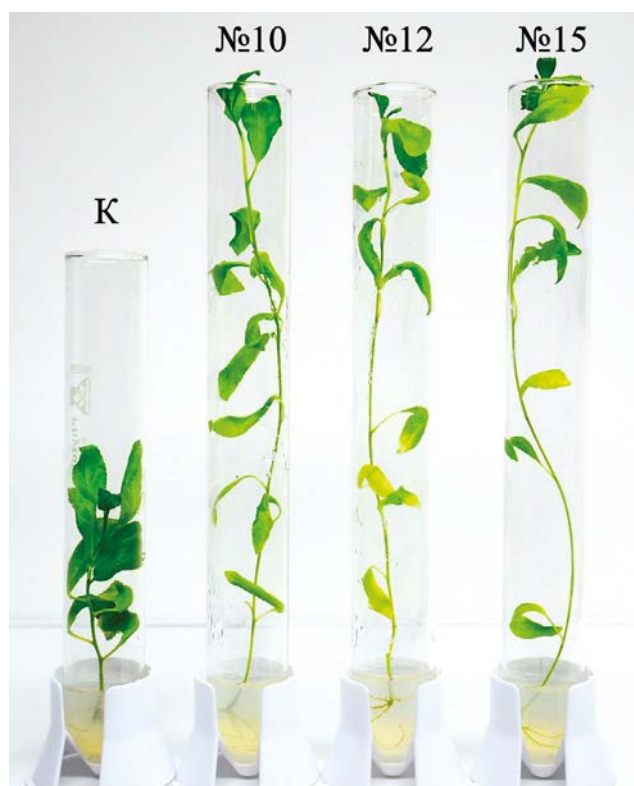


Рис. 5. Примеры некрозов некоторых линий трансгенных тополей на питательной среде с ИМК (0.15 мг/л). (а) – Некроз апикальной меристемы у линий № 1–7 после укоренения; (б) – Некроз листьев и апикальной меристемы без укоренения у линии № 8; (в) – Апикальный некроз у линий №№ 9, 12, 13 и 15 после укоренения и 30 дней роста.



та, т. е. в течение как минимум двух лет. Среди негативных эффектов трансформации, как мы уже отмечали выше, было появление верхушечных некрозов у некоторых линий, частота которых увеличивалась при выращивании растений на среде с ИМК. Вторым негативным явлением был низкий процент укоренения побегов на питательной среде при их срезании у части клонов, в результате чего часть линий была утрачена. Следует отметить, что у всех трех финально отобранных трансгенных линий апикальные некрозы отмечали крайне редко, а укоренение было близко к 100%. Не было также отмечено визуальных различий в развитии придаточной корневой системы (длина корней и их обилие) между тремя отобранными трансгенными линиями и контролем.

Рис. 6. Трансгенные линии тополя берлинского по гену *AtGA20ox1* в сравнении с контролем на питательной среде без ИМК. Возраст растений – 2 мес. Высота пробирок 15 и 20 см.

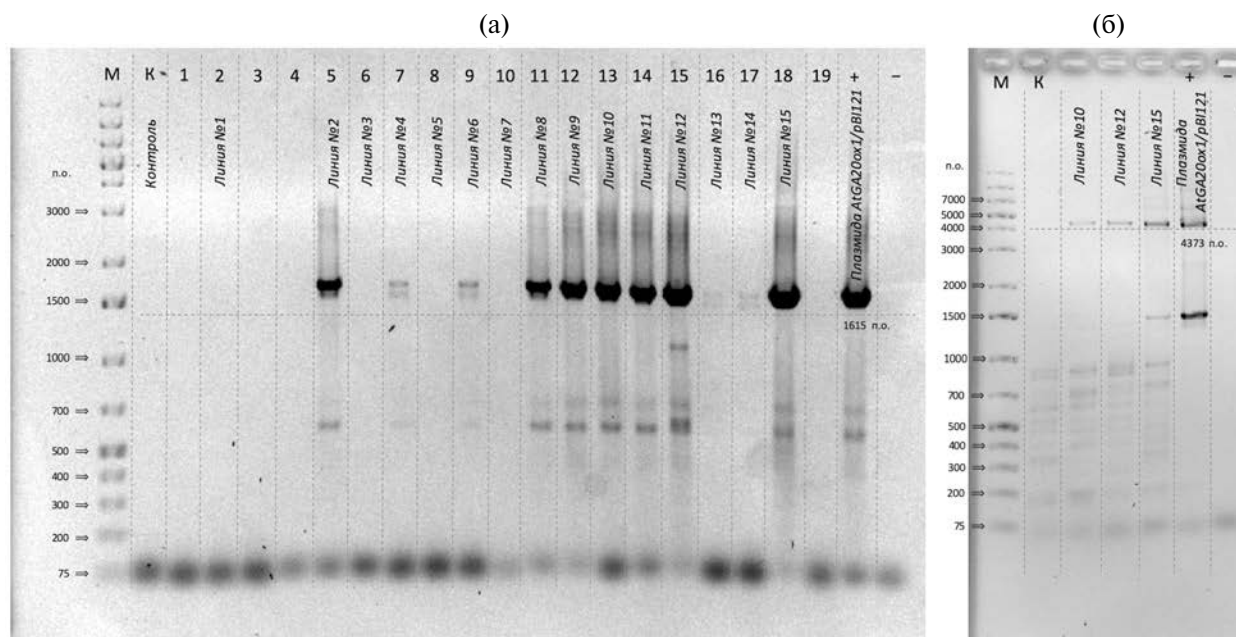


Рис. 7. ПЦР-скрининг регенерантов тополя берлинского на присутствие полнотекстовых последовательностей генов с использованием праймеров: (а) – p35_F + TNOS_R; (б) – nptII_F + M13_F. М – размерный стандарт GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (“ThermoFisher Scientific”, США), К – ДНК из контрольного растения, “+” – положительный контроль (*AtGA20ox1/pBI121*), “–” – отрицательный контроль (без ДНК).

ОБСУЖДЕНИЕ

Увеличение производства биомассы традиционно является одним из важнейших направлений селекции древесных растений [9]. Тем не менее, применение классических подходов селекции к древесным растениям существенно ограничены из-за длительных циклов размножения многих видов. Развитие технологий генетической инженерии и редактирования генома позволили проводить улучшения признаков деревьев за относительно короткое время [9]. Объектом для генетических манипуляций, целью которых является ускорение роста растений, нередко являются гены биосинтеза гиббереллинов. Гиббереллин-20-оксидаза является ключевым ферментом, определяющим синтез гиббереллинов в растениях и, следовательно, предпочтительной мишенью для генетических манипуляций, направленных на увеличение скорости роста [10]. В нашей работе мы получили тополь берлинский с конститутивной гиперэкспрессией гена *AtGA20ox1* из *A. thaliana*. Основными фенотипическими проявлениями трансформации явились выраженное удлинение стебля за счет увеличения размера междоузлий, незначительное его истончение, а также удлинение и сужение листьев. Все описанные изменения хорошо согласуются с известными функциями гиббереллинов, а также с фенотипическими проявлениями у растений после их экзогенной обработки гиббереллинами [20]. Подобные морфологические изменения отмечены и в других работах по генетической трансформации дре-

весных растений генами *GA20ox* [4, 6, 7, 10]. Стоит отметить, что в ряде работ морфологические проявления, связанные с гиперэкспрессией гиббереллина, могли со временем пропадать [7, 8]. Зафиксированные нами морфологические отличия линий тополя берлинского, трансгенных по гену *AtGA20ox1*, являются стабильными в течение двух лет поддержания культуры *in vitro*.

Анализ опубликованных экспериментальных работ показал, что трансгенез генов *GA20ox* может по-разному влиять на диаметр ствола и его биомассу. Несмотря на то, что ожидаемым эффектом все же является определенное запаздывание увеличения диаметра ствола к его удлинению или даже некоторое его утончение, тем не менее, в некоторых работах задокументировано и утолщение ствола трансгенных деревьев по сравнению с контролем. Например, в работе по трансформации гибридной осины *Populus tremula* L. × *P. tremuloides* геном *AtGA20ox1* показано увеличение диаметра ствола и его биомассы по сравнению с контролем [4]. Наши результаты больше соотносятся с работой Matthias Fladung [9], в которой была проведена подобная предыдущей трансформации *Populus tremula* L. × *P. tremuloides* геном *AtGA20ox1*. Так, в нашей работе и работе Matthias Fladung с диплоидными (но не тетраплоидными) растениями толщина стебля у трансгенных линий увеличивалась не эквивалентно его удлинению, и растения оказывались склонны к полеганию на первоначальных этапах выращивания. Схожие результаты были получены при цистегенезе

Citrus sinensis × *Poncirus trifoliata*, при котором авторы работы также наблюдали, что диаметр ствола у полученных трансгенов увеличивался меньше, чем описано для *Populus* [4]. Авторы делают вывод, что эти различия могут быть связаны с использованием разных *GA20ox* и видов растений-реципиентов (*CcGA20ox1* для цитрусового гибрида и *AtGA20ox1* для *Populus*). Работа Matthias Fladung и наши результаты по трансформации тополя берлинского тем же геном *AtGA20ox1* опровергают предположение, что эффект может иметь существенный видоспецифичный эффект или же зависеть от источника донорного гена.

Рядом работ, посвященных изучению эффектов трансгенеза генами *GA20ox* или экзогенной обработке растений активными гиббереллинами [20], отмечается ингибирование образования придаточных корней при укоренении стеблей, в том числе у древесных пород [4, 5, 9, 10]. В нашей работе мы также наблюдали плохое укоренение у большинства полученных трансгенных линий, что даже стало первопричиной потери большинства исходно отобранных клонов в связи с невозможностью их эффективного размножения путем срезания и укоренения побегов. Механизм нарушения укоренения в результате возможного увеличения выработки активных гиббереллинов не вполне очевиден и наиболее вероятно связан с непрямыми регуляторными взаимодействиями с другими фитогормонами. Известно, что ключевую роль в адвентивном укоренении играют ауксины. Гиббереллины и ауксины обычно действуют синергично, а также могут стимулировать синтез и эффект друг друга [21, 22]. В то же время при адвентивном укоренении ауксины и гиббереллины могут оказывать противоположные эффекты за счет опосредованного влияния. Например, предполагается, что гиббереллины могут тормозить адвентивное укоренение за счет изменения полярного транспорта ауксинов и изменения ауксиновых максимумов в стеблях [23]. Следует, однако, отметить, что у трех финально отобранных трансгенных линий проблем с укоренением мы не наблюдали, а укореняемость срезаемых побегов была близка к 100%. Различия в обилии и длине корней между отобранными трансгенными линиями и контролем также не наблюдали. Таким образом, плохая укореняемость большинства линий могла быть связана с перестройками генома, вызванными инсерцией Т-ДНК, а не с влиянием гиперэкспрессии *AtGA20ox1*.

Среди негативных эффектов трансформации тополя берлинского, отмеченных в нашей работе, было появление апикальных некрозов у некоторых линий, частота которых увеличивалась при выращивании растений на среде с ИМК. Апикальные некрозы не являются

типичным эффектом влияния повышенного уровня гиббереллинов на растения, и мы пока не можем указать причину таких изменений. В то же время, принимая во внимание вклад ИМК на проявление некрозов, мы склонны связывать выявленные нарушения с гормональными сдвигами. Апикальный некроз может возникать как на стадии размножения побегов, так и на стадии укоренения. Точный механизм, лежащий в основе возникновения апикальных некрозов, до сих пор остается неясным, хотя были предложены некоторые возможные причины, включая дефицит минеральных солей или различные соотношения регуляторов роста растений в питательных средах (главным образом, ауксинов и цитокининов) на определенных стадиях развития. Так, например, было показано, что апикальные некрозы могут быть вызваны недостатком экзогенных или эндогенных цитокининов у некоторых растений [24]. Известно, что цитокинины и гиббереллины действуют преимущественно антагонистически. Реципрокное взаимодействие регулируется как на уровне биосинтеза, так и на уровне передачи сигнала [22]. Таким образом, возможный повышенный уровень эндогенных гиббереллинов мог вызывать снижение уровня эндогенных цитокининов. Учитывая то, что укоренение проводилось на безгормональной среде, то общий дефицит цитокининов мог приводить к остановке делений в апикальной меристеме и гибели верхушки на фоне отсутствия корней. У части трансгенных линий с нарушенным корнеобразованием негативный эффект мог быть усилен за счет низкого уровня эндогенных цитокининов. По всей видимости, снижение уровня цитокининов относительно ауксинов могло дополнительно провоцировать образование некрозов у трансгенных линий, что наблюдалось при укоренении побегов на среде с добавлением ИМК, но без экзогенных цитокининов. Гибель верхушки, в свою очередь, могла приводить к снижению уровня эндогенных ауксинов и, соответственно, к снижению эффективности образования придаточных корней. В наших экспериментах, в действительности, мы наблюдали некрозы как до укоренения стеблей, так и после укоренения. В то же время известны примеры среди растений, когда цитокинины, напротив, могли стимулировать развитие апикальных некрозов [25]. Следует отметить, что в наших экспериментах у всех трех финально отобранных трансгенных линий поражения верхушек отмечали крайне редко, что может свидетельствовать о сбалансированности гормонального состава. Кроме того, некротические явления крайне редко, но фиксируются нами и у контрольных растений тополя берлинского *ex vitro*, что может быть следствием

гибридной природы данного вида и сдвига гормонального баланса в результате скрещивания. Повышенная частота апикальных некрозов отмечена и для других гибридных видов, например, *Populus tremula* × *P. alba* [24]. Следует отметить, что в культурах других видов тополей, поддерживаемых нами, такие изменения никогда не обнаруживаются.

В нашей работе показано, что трансформация геном *AtGA20ox1* может приводить к трехкратному увеличению скорости роста тополя в условиях *in vitro*. Несмотря на ярко выраженный фенотипический эффект, наблюдаемый у полученных трансгенных тополей, требуются дополнительные испытания *ex vitro* с целью подтверждения сохранности полученных признаков у взрослых растений, в том числе у прошедших стадию зимнего покоя. Известно, что стерильные условия *in vitro* несопоставимо отличаются от естественной среды обитания растений, где они сталкиваются с перепадами температур, различными химическими составами почв, микрофлорой, солнечной радиацией и другими факторами, способными повлиять на проявление морфологических эффектов, вызванных трансгенезом. Кроме того, утонченный ствол *in vitro* может технически усложнить адаптацию растений к грунту, так как потребует дополнительных манипуляций по приданию стволу вертикального положения после переноса растения из пробирки в сосуд с почвой. Данный факт может не только усложнить адаптацию трансгенных растений к условиям *ex vitro*, но и создать проблемы при массовом микроклональном размножении растений с подобным фенотипом для создания плантаций. Одним из возможных решений проблемы полегания растений на первоначальном этапе может быть перевод трансгенного растения из диплоидной формы в полиплоидную [9].

На сегодняшний день законодательство Российской Федерации запрещает высадку трансгенных растений в открытом грунте в промышленных масштабах. Исключение сделано только для научных целей, но это не упрощает задачу испытаний трансгенов в полевых условиях, так как остается проблема возможной интрогрессии трансгена путем перекрестного опыления близкородственных видов. Решить данную проблему можно путем редактирования генома трансгенного растения при помощи CRISPR/Cas технологии и выключения гена, ответственного за цветение, что позволит перейти к безопасным испытаниям полученных нами трансгенных растений в полевых условиях.

Полученный штамм агробактерии, несущий плазмиду *AtGa20ox1/pBI121* может быть использован для генетической трансформации других древесных растений, имеющих потенциал

к ускорению роста или изменению фенотипа с целью решения различных задач, включая ландшафтный дизайн, глубокую переработку древесины (биорефайнинг) и создание высокопродуктивных древесных плантаций.

Авторы благодарят ЦКП “Биоаналитика” СИФИБР СО РАН, Н.Е. Коротаеву за предоставление растений *A. thaliana*, И.В. Федосееву за предоставление штамма *A. tumefaciens* и вектора *uidA/pBI121*, К. З. Гамбурга за мастер-класс по микроклональному размножению растений, а также В.К. Войникова за всеобъемлющую поддержку работы.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-24-01113, <https://rscf.ru/project/22-24-01113/>).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bömke C., Tudzynski B. Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria // *Phytochem.* 2009. V. 70. P. 1876.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.05.020>
2. Yamaguchi S. Gibberellin metabolism and its regulation // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2008. V. 59. P. 225.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092804>
3. Ashikari M., Sasaki A., Ueguchi-Tanaka M., Itoh H., Nishimura A., Datta S., Ishiyama K., Saito T., Kobayashi M., Khush G.S., Kitano H., Matsuoka M. Loss-of-function of a rice gibberellin biosynthetic gene, GA20 oxidase (*GA20ox-2*), led to the rice “Green revolution” // *Breed. Sci.* 2002. V. 52. P. 143.
<https://doi.org/10.1270/jsbbs.52.143>
4. Eriksson M.E., Israelsson M., Olsson O., Moritz T. Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length // *Nat. Biotechnol.* 2000. V. 18. 7. P. 784.
<https://dx.doi.org/10.1038/77355>
5. Peng X., Tong B., Lee J., Wang K., Yu X., Huang X., Wen J., Makarem M., Pang H., Hinjan S., Yan X., Yao S., Lu F., Wang B., Peng F., et al. Overexpression of a gibberellin 20-oxidase gene in poplar xylem led to an increase in the size of nanocellulose fibrils and improved paper properties // *Carbohydr. Polym.* 2023. V. 314. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120959>
6. Park E.-J., Kim H.-T., Choi Y.-I., Lee C., Nguyen V.P., Jeon H.-W., Cho J.-S., Funada R., Pharis R.P., Kurepin L.V., Ko J.-H. Overexpression of *gibberellin 20-oxidase 1* from *Pinus densiflora* results in enhanced

- wood formation with gelatinous fiber development in a transgenic hybrid poplar // *Tree Physiol.* 2015. V. 35. P. 1264.
<https://doi.org/10.1093/treephys/tpv099>
7. Dünisch O., Fladung M., Nakaba S., Watanabe Y., Funada R. Influence of overexpression of a gibberellin 20-oxidase gene on the kinetics of xylem cell development in hybrid poplar (*Populus tremula* L. and *P. tremuloides* Michx.) // *Holzforschung.* 2006. V. 60. P. 608.
<https://doi.org/10.1515/HF.2006.10>
 8. Han K.M., Dharmawardhana P., Arias R.S., Ma C., Busov V., Strauss S.H. Gibberellin-associated cisgenes modify growth, stature and wood properties in *Populus* // *Plant Biotechnol. J.* 2011. V. 9. P. 162.
<https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00537.x>
 9. Fladung M. Growth of mixoploid *GIBBERELLIC ACID 20 OXIDASE* (*GA20-OXIDASE*) overexpressing transgenic *Populus* // *Gesunde Pflanz.* 2018. V. 70. P. 91.
<https://doi.org/10.1007/s10343-018-0418-z>
 10. Fagoaga C., Tadeo F.R., Iglesias D.J., Huerta L., Lliso I., Vidal A.M., Talon M., Navarro L., García-Martínez J.L., Peña L. Engineering of gibberellin levels in citrus by sense and antisense overexpression of a GA 20-oxidase gene modifies plant architecture // *J. Exp. Bot.* 2007. V. 58. P. 1407.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erm004>
 11. Murashige T., Skoog F. A Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. P. 473.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
 12. Pavlichenko V.V., Protopopova M.V., Voinikov V.K. A comparative study of various light source influences on the plants regenerative potential using *Populus berolinensis* root explants as an example // *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 2020. V. 548. P. 062093.
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/548/6/062093>
 13. Protopopova M.V., Pavlichenko V.V., Menzel R., Putschew A., Luckenbach T., Steinberg C.E. Contrasting cellular stress responses of Baikalian and Palearctic amphipods upon exposure to humic substances: environmental implications // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2014. V. 21. P. 14124.
<https://doi.org/10.1007/s11356-014-3323-8>
 14. Chen P.-Y., Wang C.-K., Soong S.-C., To K.-Y. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants // *Mol. Breed.* 2003. V. 11. P. 287.
<https://doi.org/10.1023/A:1023475710642>
 15. Holsters M., de Waele D., Depicker A., Messens E., van Montagu M., Schell J. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens* // *Mol. Gen. Genet.* 1978. V. 163. P. 181.
<https://doi.org/10.1007/BF00267408>
 16. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // *Phytochem. Bull.* 1987. V. 19. P. 11.
 17. Protopopova M., Pavlichenko V. *Eranthis* Salisb. (Ranunculaceae) in South Siberia: insights into phylogeography and taxonomy // *Diversity.* 2022. V. 14. P. 1.
<https://doi.org/10.3390/d14100779>
 18. Xu Y.-L., Li L., Wu K., Peeters A.J.M., Gage D.A., Zeevaart J.A.D. The GA5 locus of *Arabidopsis thaliana* encodes a multifunctional gibberellin 20-oxidase: molecular cloning and functional expression // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995. V. 92. P. 6640.
<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.92.14.6640>
 19. Shukor N.A.A., Lok Y.C.Y., Kumar S.M., Abiri R., Abdullah M.P. Molecular dissection and an in-silico approach of a novel gibberellin 20-oxidase gene of *Hibiscus cannabinus* L. // *Pak. J. Bot.* 2023. V. 55. P. 1.
[http://dx.doi.org/10.30848/PJB2023-2\(11\)](http://dx.doi.org/10.30848/PJB2023-2(11))
 20. Brian P.W. Morphogenetic effects of the gibberellins // *Bot. J. Linn. Soc.* 1959. V. 56. P. 237.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1959.tb02498.x>
 21. Sata S.J., Gokani S.J., Thaker V.S. Influence of gibberellic acid on auxin biosynthesis and their effects on coleoptile elongation in garlic // *Acta Physiol. Plant.* 2002. V. 24. P. 393.
<https://doi.org/10.1007/s11738-002-0035-3>
 22. Weiss D., Ori N. Mechanisms of cross talk between gibberellin and other hormones // *Plant Physiol.* 2007. V. 144. P. 1240.
<https://doi.org/10.1104/2Fpp.107.100370>
 23. Mauriat M., Petterle A., Bellini C., Moritz T. Gibberellins inhibit adventitious rooting in hybrid aspen and *Arabidopsis* by affecting auxin transport // *Plant J.* 2014. V. 78. P. 372.
<https://doi.org/10.1111/tpj.12478>
 24. Kataeva N.V., Alexandrova I.G., Butenko R.G., Dragavtceva E.V. Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured *in vitro* // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1991. V. 27. P. 149.
<https://doi.org/10.1007/BF00041283>
 25. Teixeira da Silva J.A., Nezami-Alanagh E., Barre-al M.E., Kher M.M., Wicaksono A., Gulyás A., Hidvégi N., Magyar-Tábori K., Mandler-Drienyovszki N., Márton L., Landín M., Gallego P.P., Driver J.A., Dobránszki J. Shoot tip necrosis of in vitro plant cultures: a reappraisal of possible causes and solutions // *Planta.* 2020. V. 252. P. 1.
<https://doi.org/10.1007/s00425-020-03449-4>

УДК 581.1, 57.043, 635.15

ВЛИЯНИЕ СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА СВЕТОВОЙ СРЕДЫ НА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЕ, ЭЛЕКТРО- И МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ РЕДИСА В УСЛОВИЯХ СВЕТОКУЛЬТУРЫ

© 2024 г. Т. Э. Кулешова^а*, П. В. Желначева^а, Е. М. Эзерина^а, В. Е. Вертебный^а,
Ю. В. Хомяков^а, Г. Г. Панова^а, А. А. Кочетова^а, Н. Г. Синявина^а

^аФедеральное государственное бюджетное научное учреждение
Агрофизический научно-исследовательский институт, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: www.piter.ru@bk.ru

Поступила в редакцию 21.08.2023 г.

После доработки 15.10.2023 г.

Принята к публикации 02.11.2023 г.

В работе рассмотрены особенности влияния источников света, имитирующих солнечное освещение с различным спектральным составом с соотношением синего : зеленого : красного диапазонов 11% : 35% : 54% (AFI-3000), 19% : 38% : 43% (AFI-4000) и 25% : 38% : 37% (AFI-5000), на морфометрические, биохимические, фотосинтетические и электрогенные параметры редиса (*Raphanus sativus* L.) для светокультуры сорта Петербургский фиолетовый. Проведенные исследования выявили достоверное увеличение урожая корнеплодов (3.45 кг/м² за 28 суток вегетации), содержания сухого вещества до 8.9% и фотосинтетических пигментов, уменьшение количества нитратов до 1206 мг/кг у растений редиса, освещаемых светильниками AFI-5000 со спектром, близким к солнечному излучению в полдень. В данном варианте наблюдали повышение коэффициентов эффективного квантового фотохимического выхода фотосистемы ФС II Y (II) = 0.206, фотохимического qP = 0.304 и нефотохимического qN = 0.415 тушения флуоресценции, а также высокую генерацию разности потенциалов до 532 мВ в корнеобитаемой среде по сравнению с AFI-3000, моделирующим свет солнца у горизонта, при освещении которым наблюдалась высокая доля рассеяния света листом (R800 = 1.716), и AFI-4000 со спектром, приближенным к утреннему свету. Вариант AFI-4000 показал наихудший результат — повышенные нерегулируемые потери энергии возбуждения Y (NO) = 0.712 и пропускание света листовой поверхностью 7.5%. Применение источника света AFI-5000 способствовало получению более высоких показателей, характеризующих как выход растительной продукции, так и активность фотосинтетического аппарата и интенсивность электрогенных процессов в корнеобитаемой среде, что позволяет рекомендовать светильник данного типа для выращивания корнеплодных культур в условиях светокультуры. Вероятно, этот положительный эффект связан с наличием в спектре большей доли синего света, влияющего на развитие корневой системы.

Ключевые слова: *Raphanus sativus*, биохимический состав, корнеобитаемая среда, разность потенциалов, световая среда, светодиодные светильники, спектры отражения, продуктивность, флуоресценция

DOI: 10.31857/S0015330324020105, EDN: OAORNF

ВВЕДЕНИЕ

В последнее десятилетие в мире наблюдается значительный рост производства растительной продукции в контролируемых условиях среды с использованием искусственно создаваемого освещения [1]. В настоящее время автоматизи-

рованные растительные фабрики (ситифермы, вертикальные фермы, фитотехкомплексы и др.) различного масштаба используют для производства растительной продукции в большинстве стран Азии, Америки, Австралии и Европы [2–4]. Производство в сооружениях искусственного климата постоянно развивается и совершенствуется как в области технологий выращивания, так и в плане ассортимента растительных культур [3, 5]. При выращивании растений в условиях светокультуры одним из ключевых факторов получе-

Сокращения: ДНаТ — дуговые натриевые трубчатые лампы; ДНаЗ — дуговые натриевые зеркализированные лампы; е.в. — естественная влажность; с.в. — сухое вещество; ФАР — фотосинтетически активная радиация; ФС II — фотосистема II.

ния высоких урожаев является правильный подбор скороспелых образцов, ценных по комплексу биохимических, физиологических и хозяйственных признаков. В настоящее время в сооружениях искусственного климата наиболее значительную часть производимой продукции составляют листостебельные овощные культуры, прежде всего компактные и быстрорастущие представители семейств Asteraceae и Brassicaceae, что объясняется более высокой рентабельностью их производства в этих условиях [6, 7]. Редис (*Raphanus sativus* L.) относится к капустным культурам (сем. Brassicaceae) и, благодаря компактным размерам, скороспелости (до 12 вегетаций в год) и ценному биохимическому составу, является перспективной культурой для современных растительных фабрик, оборудованных многоуровневыми системами выращивания. Использование высокопродуктивных образцов с малоопушенным типом листа может повысить рентабельность возделывания культуры за счет того, что они практически целиком могут быть использованы в пищу, что является важным требованием, предъявляемым к растениям, предназначенным для коммерческого производства в сооружениях искусственного климата. Однако развитие растений контролируется не только генетически заложенными признаками, но и определяется параметрами окружающей среды. Регулируемые условия выращивания существенно ускоряют процесс отбора и выведения новых сортов и гибридов различных культур; их применение позволяет максимально точно оценить влияние генотипа и моделируемых факторов на фенотипическое проявление хозяйственно ценных признаков, таких как урожай и его структура, товарные качества растительной продукции, ее биохимический состав, устойчивость растений к действию неблагоприятных стрессовых условий [8, 9].

Световая среда — поле оптического излучения в занятой растениями части пространства, определяемое естественным или искусственным освещением в культивационном помещении и фитоценозом [10], является одним из важнейших факторов, влияющих как на работу фотосинтетического аппарата, так и на продуктивность, качество и физиологические параметры растений в целом. При правильном выборе условий освещения — интенсивности, спектрального состава, длительности и пространственного распределения — можно контролировать рост растений и регулировать биохимический состав, что является перспективной экологически безопасной альтернативной химическим регуляторам роста [11, 12].

На данный момент накоплено множество экспериментальных данных по влиянию искусственно создаваемых условий световой среды на физиологические параметры растений [13–16].

Тем не менее, вопросы оптимизации продукционного процесса и снижения себестоимости растительной продукции в светокультуре еще не решены окончательно, и ключевое значение для дальнейшего развития производства в условиях защищенного грунта принадлежит разработке и внедрению источников света, эффективных как с точки зрения получения высококачественной растительной продукции, так и экономически выгодных [2]. Нерешенной проблемой остается согласование, с одной стороны, энерго- и ресурсосберегающих технологий освещения, а с другой — нормативных биохимических показателей и вкусовых качеств растительных культур, которые в полной мере зависят от количественных и спектральных характеристик излучения. Исследования последних лет показывают, что растениям для реализации продукционного потенциала необходим полный спектр излучения, приближенный к естественному освещению в видимой области [17, 18], поскольку солнечный спектр содержит в себе все функциональные длины волны как для работы фотосинтетического аппарата с максимумами поглощения света в синей и красной областях спектра, так и для реализации вторичных процессов — от аккумуляции энергии до активации защитных механизмов в растениях [19].

Солнечный свет может быть использован напрямую с применением прозрачных одноярусных теплиц или передан через оптоволоконно с помощью концентратора на основе линзы Френеля с коэффициентом эффективности 0.28–0.40 [20]. Оба эти пути зависят от времени и погоды. Другой подход — это моделирование естественного излучения с помощью искусственного освещения [21].

В настоящее время можно выделить три типа источников света, которые применяются для выращивания растений — дуговые натриевые трубчатые (ДНАТ) и зеркализированные (ДНАЗ) лампы высокого давления, люминесцентные лампы и светодиоды, имеющие высокую перспективу для применения в растениеводстве [4]. Натриевые лампы высокого давления обладают высокой световой отдачей (до 160 лм/Вт) и наиболее распространены в растениеводстве защищенного грунта, однако им свойственно высокое тепловое излучение и низкое качество спектральной эмиссии в синей области. Спектр люминесцентных ламп близок к естественному солнечному свету и они могут быть использованы в многоярусных установках в непосредственной близости к растительному покрову, так как не сильно нагреваются при работе, однако данные источники света обладают низкой световой отдачей (50–70 лм/Вт) и малым сроком службы (около 10 000 ч). Светодиодные светильники стремительно завоевывают рынок

и становятся популярными системами освещения в тепличных хозяйствах и ситифермах [22]. Они зарекомендовали себя как наиболее энергоэффективные источники света. Немаловажной особенностью светодиодного освещения является равномерный поток излучения по всей облучаемой поверхности, возможность создавать практически любой спектр в видимой области и устанавливать источники света в непосредственной близости от растения из-за низкой температуры нагрева светильников во время работы.

Развитие светодиодных технологий позволило смоделировать естественное освещение с помощью нанесения люминофоров различного состава на белые [23] и ультрафиолетовые светодиоды [21]. С использованием спектра излучения, приближенного к солнечному свету, для растений салата была получена большая площадь листа и, соответственно, фотоассимилирующей поверхности, в результате чего наблюдался прирост биомассы по сравнению с освещением белыми светодиодами [24]. Для растений редиса показано, что повышения его продуктивности можно добиться с использованием полноспектрального излучения в области ФАР, особенно на ранних этапах развития [25].

Таким образом, все чаще при производстве культурных растений используют источники света, формирующие электромагнитные волны с диапазонами, соответствующими не только пикам поглощения хлорофиллов в красной и синей частях спектра, а всей области ФАР [24, 26], роль и механизм влияния которой на различные растительные культуры еще предстоит выяснить.

Цель работы — изучение особенностей влияния полноспектрального состава фотосинтетически активной радиации на морфологические и биохимические параметры и показатели развития редиса для оптимизации его культивирования в сооружениях искусственного климата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования и условия выращивания. В ФГБНУ АФИ с использованием методологии ускоренного получения трансгрессий по хозяйственно ценным признакам растений [27] был создан сорт редиса Петербургский фиолетовый для светокультуры, с салатным типом листа [28], выбранный в качестве объекта исследования. Данный сорт характеризуется скороспелостью, компактной листовой розеткой и устойчивостью к загущенному посеву.

Исследования проводили на биополигоне ФГБНУ АФИ с регулируемыми условиями микроклимата [29]. Редис высевали сухими семенами в пластиковые кассеты для рассады размером $53 \times 32 \times 6$ см. Густота стояния составляла 160 растений/м². В качестве корнеобитае-

мой среды использовали торфяной грунт (Агробалт С, ООО “Пиндstrup”, Россия) на основе верхового торфа низкой степени разложения, содержащий не менее: N — 150 мг/л, P₂O₅ — 150 мг/л, K₂O — 250 мг/л, Mg — 30 мг/л, Ca — 120 мг/л. Температура воздуха поддерживалась в пределах +20...+22°C днем и +18...+20°C ночью, относительная влажность воздуха — 65–70%. Полив осуществляли водой, чередуя с подкормками раствором Кнопа (три раза в неделю), влажность субстрата поддерживали на уровне $65 \pm 5\%$ от полной влагоемкости.

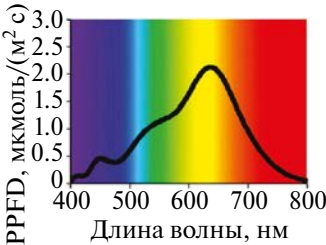
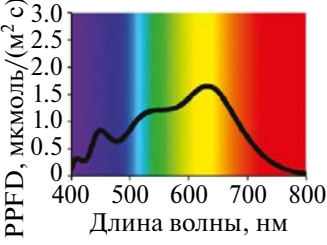
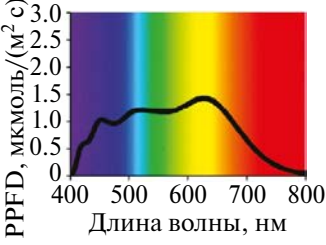
Источники света. Для исследования роли состава световой среды с различной интенсивностью излучения в значимых областях ФАР были выбраны три различных спектра излучения, моделирующих естественное освещение в различное время суток [30] и реализованных нами в следующих источниках света: 1) AFI-3000 — светодиодные светильники с цветовой температурой 3000 К со спектральным составом в видимой области, приближенным к естественному свету, когда солнце находится у горизонта; 2) AFI-4000 — светодиодные светильники с цветовой температурой 4000 К с наиболее нейтральным освещением, приближенным к утреннему и послеобеденному свету; 3) AFI-5000 — светодиодные светильники с цветовой температурой 5000 К со спектром, близким к солнечному свету в полдень (табл. 1). Светильники созданы на базе светодиодов нового поколения, излучающих фиолетовый свет и покрытых трехкомпонентным люминофором, преобразующим его в полноспектральный с полноценной красной, зеленой и синей составляющими. Величина плотности фотосинтетического потока фотонов PPFD была для всех вариантов одинаковая и составляла порядка 320 ± 20 мкмоль/(м²·с). Продолжительность светового периода составляла 14 ч/сут. Следует отметить, что источник света AFI-5000 характеризовался наличием наибольшей доли синего света в спектре — соотношение синего (400–500 нм) к зеленому (500–600 нм) и к красному (600–700 нм) диапазонам для него составило 1 : 1.5 : 1.5, для AFI-4000 — 1 : 2 : 2.3, для AFI-3000 — 1 : 3.3 : 5.2.

Морфометрические показатели. Уборку растений осуществляли на 28 сут от посева семян. При уборке учитывали массу листьев и корнеплодов, размер листовой розетки и корнеплодов, процент товарных корнеплодов. К товарным относили корнеплоды массой выше 8 г, без дефектов. На основании полученных данных рассчитывали следующие индексы:

— индекс хозяйственной эффективности, определяемый как отношение массы корнеплода к общей массе растения;

— индекс аттракции, равный отношению массы корнеплода к массе листьев;

Таблица 1. Параметры использованных светодиодных светильников

Характеристика	Светодиодный светильник AFI-3000	Светодиодный светильник AFI-4000	Светодиодный светильник AFI-5000
Спектр излучения			
PPFD в области 400–700 нм, μмоль/(м²·с)	323 ± 21	314 ± 24	320 ± 23
PPFD в синей области (400–500 нм), μмоль/(м²·с)	34 ± 2	59 ± 5	79 ± 6
PPFD в зеленой области (500–600 нм), μмоль/(м²·с)	113 ± 7	119 ± 9	121 ± 9
PPFD в красной области (600–700 нм), μмоль/(м²·с)	176 ± 11	136 ± 10	120 ± 9
Облученность, Вт/м²	71.7 ± 4.7	71.0 ± 5.4	73.5 ± 5.2
Цветовая температура, К	3011	4156	5262
Индекс цветопередачи CRI, %	97.8	98.0	97.5

— индекс формы корнеплода, определяемый как отношение длины корнеплода к диаметру корнеплода.

Биохимический состав получаемой растительной продукции. Определение содержания сухого вещества и влаги проводили методом воздушно тепловой сушки [31], сырую золу — методом сухого озоления [31], нитраты — ионометрическим методом в мг/кг сырого веса (естественной влажности, е.в.) [32], витамин С — титриметрическим методом в мг/100 г е.в. [33], сахара — титриметрическим методом по Бертрону в процентах от сухого вещества [31], хлорофилл *a* и *b*, каротиноиды — фотометрическим методом [31] в мг/100 г е.в., фосфор — фотометрическим методом определения содержания фосфора [33], калий — пламенно-фотометрическим методом [33], магний, кальций, натрий [33] и медь, цинк, железо, марганец [34] — методом пламенной атомно-адсорбционной спектроскопии в % от сухого вещества (с.в.).

Спектры отраженной от поверхности листьев радиации регистрировали неинвазивным способом с помощью миниатюрной оптоволоконной спектрометрической системы (“Ocean Optics”,

США), которая обеспечивает оптическое разрешение 0.065 нм в диапазоне от 400 до 1100 нм с шагом 0.3 нм. Для регистрации спектров датчик располагали в средней части листовой пластинки, избегая попадания на центральную жилку. В среднем для каждого варианта регистрировали 10–15 спектров. По полученным спектрам отражения рассчитывали следующие параметры, коррелирующие с фотосинтетической активностью и отражающие физиологическое состояние растений:

— индекс отражения хлорофилла $ChlRI = (R_{750} - R_{705}) / (R_{750} + R_{705} - 2R_{445})$, где R_{750} , R_{705} , R_{445} — интенсивность отражения света от листовой поверхности на длинах волн 750, 705 и 445 нм соответственно [35];

— отношение суммы каротиноидов к сумме хлорофиллов $SIPi = (R_{800} - R_{445}) / (R_{800} - R_{680})$, где R_{800} , R_{445} , R_{680} — интенсивность отражения света от листовой поверхности на длинах волн 800, 445 и 680 нм соответственно [36];

— фотохимический индекс отражения $PRI = (R_{570} - R_{531}) / (R_{570} + R_{531})$, где R_{570} , R_{531} — интенсивность отражения света от листовой поверхности на длинах волн 570 и 531 нм соответственно [37];

— индекс интенсивности рассеяния света R800, обусловленной структурными особенностями листьев и определяемый как интенсивность отражения на длине волны 800 нм [35].

Спектры пропускания света листовой поверхностью регистрировали с помощью спектрального ФАР-метра PG200N (“UPRtek”, Тайвань). Датчик с фотоэлементом диаметром 6 мм и косинусным корректором размещали под листом растения, в верхней его части и сбоку от центральной жилки. Измеряли интенсивность света, проходящего сквозь листовую поверхность, затем лист отодвигали и регистрировали интенсивность излучения источника света в данном положении. По полученным данным определяли коэффициент пропускания K_T по следующей формуле:

$$K_T = I_L / I_S,$$

где I_L — интенсивность света, прошедшего сквозь лист растения, I_S — интенсивность излучения источника света.

Параметры флуоресценции ФС II листьев редиса регистрировали с помощью анализатора эффективности фотосинтеза — импульсного портативного флуориметра MINI-PAM-II (“Walz”, Германия) в соответствии со стандартной методикой [38]. Уровень минимальной (возбуждается светом с очень низкой интенсивностью) и максимальной (возбуждается насыщающим световым импульсом) флуоресценции определяли после экспозиции листьев в течение 30 мин в темноте. С использованием специального программного обеспечения WinControl-3 рассчитывали следующие параметры флуоресценции:

— максимальный фотохимический квантовый выход $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$, где F_o — уровень минимальной флуоресценции, F_m — уровень максимальной флуоресценции [39];

— эффективный фотохимический или реальный квантовый выход $Y(II) = (F'_m - F_t)/F'_m$, где F'_m — максимальный выход флуоресценции адаптированного к свету образца, индуцируется насыщающим импульсом, временно закрывающим все реакционные центры ФС II, F_t — мгновенный или стационарный уровень флуоресценции адаптированного к свету образца, измеренному прямо перед насыщающим импульсом [40];

— коэффициент фотохимического тушения флуоресценции на свету q_P , основанный на модели лужи — концепции отдельных антенных блоков ФС II [41];

— коэффициент фотохимического тушения флуоресценции в случае взаимосвязанных антенн ФС II q_L , основанный на модели озера — множество реакционных центров равномерно распределены по взаимосвязанным антенным блокам ФС II [42];

— коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции на свету q_N [41];

— коэффициент зеаксантин-зависимого нефотохимического тушения NPQ [43];

— коэффициент квантового выхода свето-индуцированного (ΔpH -и зеаксантин-зависимого) нефотохимического тушения флуоресценции $Y(NPQ)$ [44];

— коэффициент квантового выхода нерегулируемой диссипации тепла и эмиссии флуоресценции, которые не включают транстилакоидную ΔpH и зеаксантин, $Y(NO)$ [44].

Разность потенциалов в системе корнеобитаемая среда-растения. Измерение электрических характеристик осуществляли путем размещения в биоэлектрохимических ячейках объемом 440 см³ биосовместимых коррозионостойких электродов размером 60 × 60 мм в корнеобитаемой среде, что обеспечивало поверхностный электрический контакт с корневой системой и прикорневой зоной [45]. Нижний электрод располагался на расстоянии 30 мм от дна емкости и был выполнен из графитового войлока толщиной 5 мм. Верхний электрод из сетки из нержавеющей стали с размером ячейки 8 × 8 мм размещался на расстоянии 30 мм от нижнего электрода и был электроотрицателен по отношению к нему. Мониторинг изменения разности потенциалов между электродами в корнеобитаемой среде в процессе развития растений редиса проводили с помощью аппаратной платформы Arduino (“Arduino Software”, Китай) каждые 15 мин в течение всего вегетационного периода.

Статистический анализ. Вегетационный опыт проводили дважды, размер оцениваемой выборки — 10 растений в каждом варианте опыта. Статистическая оценка полученных данных проводилась путем расчета основных описательных характеристик: среднего, стандартного отклонения, доверительного интервала с применением программ Excel 2016 и Statistica 8 (“Stat-Soft, Inc.”, США). Апостериорный тест Тьюки был использован для выявления различий между средними значениями для каждой характеристики. Значение $P \leq 0.05$ считалось приемлемым пределом статистической значимости. Значения с разными верхними индексами в столбце достоверно различались ($P \leq 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфометрические показатели. Результаты анализа морфометрических показателей растений редиса, выращенных под светодиодными источниками света разного спектрального состава, свидетельствуют о влиянии спектра оптического излучения на формирование надземной и подземной частей редиса и перераспределение ассимилятов между листовой розеткой и фор-

мирующим корнеплодом. Общая масса растений имела близкие значения во всех вариантах опыта; однако под светильниками AFI-5000 наблюдалась четко выраженная тенденция к формированию более крупных корнеплодов и более мелкой листовой розетки по сравнению с вариантами AFI-4000 и AFI-3000 (табл. 2). Так, масса корнеплода в варианте AFI-5000 по сравнению с вариантами AFI-4000 и AFI-3000 была выше на 7 и 10% соответственно; индекс хозяйственной эффективности — на 8%; индекс аттракции — на 31 и 26% соответственно. Различия по величинам индексов аттракции и хозяйственной эффективности для варианта AFI-5000 были статистически достоверными ($P \leq 0.05$). Высота розетки, длина и ширина листовой пластинки, длина черешка были наименьшими в варианте источника света с цветовой температурой 5000 К, при этом растения во всех вариантах опыта формировали одинаковое количество листьев. Наиболее значительные различия между вариантами были выявлены в отношении показателя “процент товарных корнеплодов”: наименьшее значение данного показателя было отмечено в варианте 3000 К (70%), наибольшее — в варианте 5000 К (95%), что отразилось на общем урожае растений. Урожай корнеплодов в варианте AFI-5000 был максимальным среди изученных вариантов (3.45 кг/м²) и достоверно превышал таковой для вариантов AFI-4000 и AFI-3000 на 18 и 47% соответственно. Следует отметить, что сорт редиса Петербургский фиолетовый с салатным типом листа можно употреблять в пищу в свежем виде целиком, поэтому общая урожайность растений с учетом надземной части выше на 30–40%. Результаты исследования урожая товарных корнеплодов показали, что эффективность использования светильников располагается в последовательности AFI-5000 > AFI-4000 > AFI-3000.

Биохимический состав. Содержание сухого вещества и пигментов в листьях редиса также было подвержено влиянию спектрального состава света. Было выявлено повышение содержания сухого вещества в последовательности AFI-3000 < AFI-4000 < AFI-5000, различия были статистически достоверны ($P \leq 0.05$) между вариантами AFI-3000 и AFI-5000. Также получено статистически значимое повышение содержания фотосинтетических пигментов в той же последовательности (табл. 3). Содержание хлорофилла *a*, *b*, суммы хлорофиллов и каротиноидов в варианте AFI-5000 по сравнению с AFI-3000 было достоверно выше на 18, 22, 18 и 14% соответственно; по сравнению с AFI-4000 — на 10, 19, 12 и 4% соответственно. По содержанию нефотосинтетических пигментов (антоцианов) различий между вариантами не обнаружено.

Биохимический анализ корнеплодов показал, что в варианте AFI-5000 содержание сухого

вещества было достоверно выше, чем в остальных вариантах. Наименьшим содержанием сухого вещества характеризовался вариант AFI-4000 (отличия достоверны при $P \leq 0.05$). Нитраты, содержание которых во всех образцах не превышало ПДК, в меньшей степени накапливались в варианте AFI-5000, где их количество было на 35% меньше, чем в варианте AFI-3000, и на 31% меньше, чем в варианте AFI-4000 (табл. 4). Прослеживалась тенденция к некоторому снижению содержания витамина С от AFI-3000 к AFI-5000. Более низкое содержание моносахаров и суммы сахаров наблюдалось в варианте AFI-4000, в то время как содержание дисахаров было максимальным в варианте AFI-5000, превышая таковое в остальных вариантах в 4 раза.

Данные по содержанию макро- и микроэлементов в исследованных вариантах представлены на рис. 1. В большинстве случаев наблюдалось более высокое содержание элементов для варианта AFI-5000 по сравнению с таковым в вариантах AFI-3000 и AFI-4000: так, в листьях было больше кальция на 28 и 19% (рис. 1а), цинка — на 38 и 50%, марганца — на 1 и 21%, меди — на 255 и 63% соответственно (рис. 1в). В корнеплодах обнаружено значительное повышение содержания микроэлементов при освещении растений источником AFI-5000 — более чем на 50% для железа, цинка и марганца по сравнению с AFI-3000 и AFI-4000 (рис. 1г), тогда как количество макроэлементов практически не отличалось между вариантами (рис. 1б). Для варианта AFI-3000 можно отметить увеличенное содержание калия на 23 и 10% и железа на 46 и 26% в листьях относительно AFI-4000 и AFI-5000 соответственно. В листьях для варианта AFI-4000 наблюдалось повышенное количество магния на 18 и 10%, натрия — на 84 и 119% относительно AFI-3000 и AFI-5000 соответственно.

Интенсивность флуоресценции. Параметры флуоресценции, характеризующие эффективность работы фотосинтетического аппарата, регистрировали на 22 день вегетационного периода на развитых листьях верхнего яруса (рис. 2). Максимальный фотохимический квантовый выход Fv/Fm практически не отличался между вариантами и составлял 0.819 для AFI-3000 и AFI-5000 и 0.820 для AFI-4000. Реальный квантовый выход Y(II), характеризующий соотношение числа квантов, используемых в фотохимических реакциях, к общему числу поглощенных квантов, был достоверно выше на 88% для растений редиса, освещаемых AFI-5000, по сравнению с использованием светильников AFI-4000, и в виде тенденции на 12% больше, чем для источников света AFI-3000. Пониженное значение Y(II) может быть показателем снижения эффективности ассимиляции и замедления переноса электронов в ФСІ и ФСІІ. Коэффициент фото-

Таблица 2. Морфометрические параметры растений редиса при их выращивании с использованием источников света различного спектрального состава

Параметр	Светодиодный светильник AFI-3000	Светодиодный светильник AFI-4000	Светодиодный светильник AFI-5000
Вид растений			
Масса общая, г	30.31 ± 1.95^a	31.14 ± 4.32^a	30.68 ± 4.96^a
Масса корнеплода, г	19.97 ± 1.51^a	20.53 ± 3.16^a	21.89 ± 3.88^a
Масса листьев, г	10.34 ± 1.11^a	10.62 ± 1.27^a	8.79 ± 1.40^a
Индекс хозяйственной эффективности	0.66 ± 0.03^a	0.66 ± 0.02^a	0.71 ± 0.03^b
Индекс аттракции	2.00 ± 0.23^a	1.93 ± 0.15^a	2.52 ± 0.34^b
Высота розетки, см	13.43 ± 0.27^a	14.25 ± 0.96^a	12.70 ± 1.24^a
Диаметр розетки, см	17.00 ± 1.46^a	17.75 ± 1.00^a	16.50 ± 1.71^a
Число листьев	6.57 ± 0.27^a	6.75 ± 0.39^a	6.70 ± 0.42^a
Длина листа, см	10.86 ± 0.64^a	10.12 ± 0.53^a	9.95 ± 0.36^a
Ширина листа, см	6.93 ± 0.31^a	6.75 ± 0.36^a	6.25 ± 0.51^a
Длина черешка	6.43 ± 0.27^a	7.63 ± 0.77^b	6.30 ± 0.59^a
Длина корнеплода, см	5.29 ± 0.20^a	5.63 ± 0.63^a	5.50 ± 0.57^a
Диаметр корнеплода, см	2.47 ± 0.10^a	2.21 ± 0.35^b	2.76 ± 0.20^a
Индекс корнеплода	2.15 ± 0.21^a	2.57 ± 0.39^a	2.01 ± 0.22^a
Товарность, %	70 ± 4^a	85 ± 6^b	95 ± 4^c
Урожай, кг/м ²	2.35 ± 0.28^a	2.93 ± 0.21^b	3.45 ± 0.27^c

Таблица 3. Содержание сухого вещества и пигментов в листьях редиса при их выращивании с использованием источников света различного спектрального состава

Параметр	Светодиодный светильник AFI-3000	Светодиодный светильник AFI-4000	Светодиодный светильник AFI-5000
Сухое вещество, %	7.83 ± 0.50^a	$8.48 \pm 0.41^{a,b}$	8.88 ± 0.50^b
Хлорофилл <i>a</i> , мг/100 г е.в.	109.77 ± 6.15^a	$120.72 \pm 7.73^{a,b}$	129.66 ± 8.30^b
Хлорофилл <i>b</i> , мг/100 г е.в.	40.06 ± 2.24^a	47.51 ± 3.04^b	48.96 ± 3.13^b
Сумма хлорофиллов <i>a + b</i> , мг/100 г е.в.	149.84 ± 8.39^a	$168.23 \pm 10.77^{a,b}$	176.62 ± 11.43^b
Каротиноиды, мг/100 г е.в.	34.56 ± 1.93^a	$36.06 \pm 2.31^{a,b}$	39.46 ± 2.53^b
Антоцианы, мг/100 г е.в.	0.023 ± 0.006^a	0.013 ± 0.004^a	0.018 ± 0.04^a

Таблица 4. Содержание сухого вещества, нитратов, витамина С и сахаров в корнеплодах редиса при их выращивании с использованием источников света различного спектрального состава

Параметр	Светодиодный светильник AFI-3000	Светодиодный светильник AFI-4000	Светодиодный светильник AFI-5000
Сухое вещество, %	4.75 ± 0.23 ^a	4.06 ± 0.23 ^b	5.31 ± 0.30 ^c
Нитраты, мг/кг е.в.	1867.9 ± 224.2 ^a	1743.3 ± 209.2 ^a	1206.0 ± 144.8 ^b
Витамин С, мг/100 г е.в.	8.58 ± 0.76 ^a	8.14 ± 0.78 ^a	7.70 ± 0.74 ^a
Моносахара, % с.в.	32.24 ± 2.48 ^a	21.39 ± 2.05 ^b	25.49 ± 2.45 ^b
Дисахара, % с.в.	1.03 ± 0.11 ^a	0.95 ± 0.11 ^a	3.97 ± 0.48 ^b
Сумма сахаров, % с.в.	33.27 ± 2.94 ^a	22.34 ± 2.17 ^b	29.64 ± 2.92 ^a

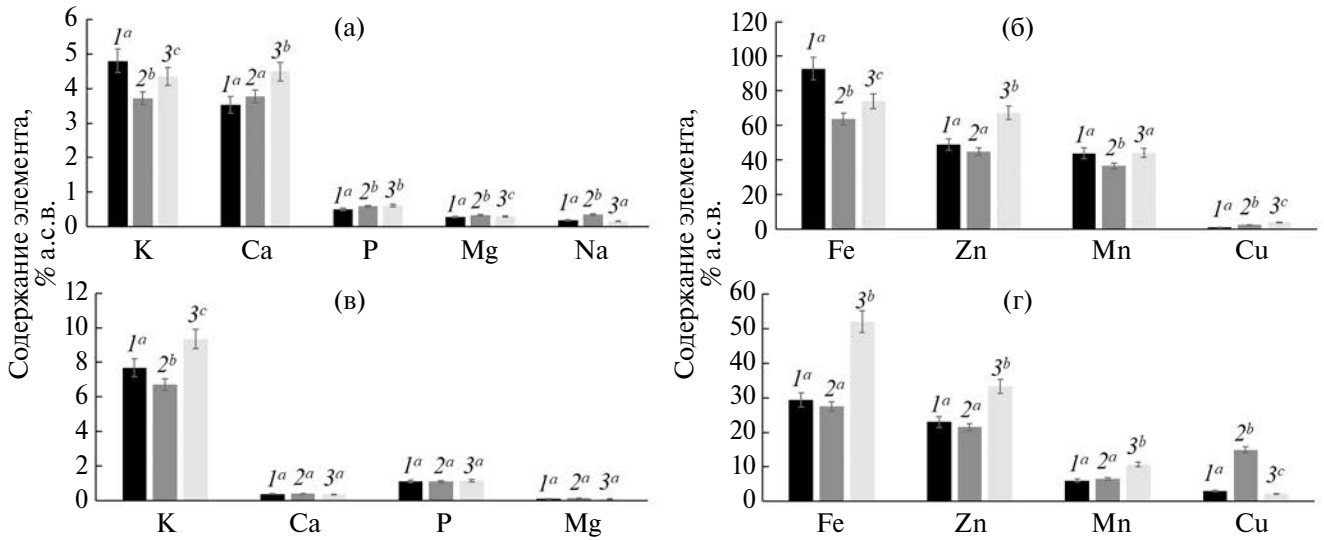


Рис. 1. Содержание калия, кальция, фосфора, магния, натрия в листьях (а) и корнеплодах (в) редиса; железа, цинка, марганца, меди в листьях (б) и корнеплодах (г) редиса при выращивании с использованием источников света различного спектрального состава: 1 – AFI-3000, 2 – AFI-4000, 3 – AFI-5000.

химического тушения флуоресценции на свету qP, рассчитываемый по концепции отдельных антенных блоков ФС II, и коэффициент qL, определяемый исходя из того, что множество реакционных центров равномерно распределены по взаимосвязанным антенным блокам ФС II, коррелировали между собой (коэффициент корреляции $r = 1$) и были статистически достоверно выше для варианта AFI-5000 – qP на 94%, qL на 139% относительно AFI-4000 и в виде тенденции – qP на 11%, qL на 14% по сравнению с AFI-3000. Коэффициенты нефотохимического тушения флуоресценции на свету qN и зеаксантин-зависимого нефотохимического тушения NPQ так же, как и ожидалось, коррелировали между собой (коэффициент корреляции $r = 0.99$) и имели достоверно увеличенное значение для AFI-5000 – qN на 31%, NPQ на 65% относительно AFI-4000 и в виде тенденции – qN на 2%, NPQ на 4% по сравнению с AFI-3000. Коэффициенты

Y(NPQ) квантового выхода свето-индуцированного (ΔpH -и зеаксантин-зависимого) нефотохимического тушения флуоресценции были одинаковыми для вариантов AFI-3000 и AFI-5000 и превышали вариант AFI-4000 на 30%. Коэффициент Y(NO) квантового выхода нерегулируемой диссипации тепла и эмиссии флуоресценции для варианта AFI-4000 был статистически достоверно выше на 22% по сравнению с AFI-3000 и на 27% относительно AFI-5000. Высокое значение Y(NO) сигнализирует о том, что избыточная энергия возбуждения достигает реакционных центров, что приводит к сильному снижению активности акцепторов ФС II и фотоповреждению.

Индексы отражения света листовой поверхностью. Индексы отражения, характеризующие емкость и эффективность работы фотосинтетического аппарата растений редиса, регистрировали на 26 день вегетационного периода (рис. 3). Полученные индексы отражения хлорофилла

ChlRI статистически не различались между вариантами, однако наблюдалась некоторая тенденция к увеличению этого показателя для варианта AFI-3000 на 3 и 7% относительно AFI-4000 и AFI-5000 соответственно. С одной стороны, это не соотносится с биохимическими данными по содержанию пигментов в исследованных образцах, где наибольшее количество хлорофиллов было характерно для листьев растений редиса, освещаемых в процессе роста светильниками AFI-5000. Однако при этом для варианта AFI-3000 также зарегистрировано достоверное увеличение индекса интенсивности рассеяния света R800 — на 18% по сравнению с AFI-5000 и в виде тенденции на 6% относительно AFI-4000, что может говорить о менее эффективном использовании световой энергии листьями в данном варианте освещения. ChlRI характеризует емкость фотосинтетического аппарата растений и потенциальную возможность растения поглощать свет, а SIPI и R800 — эффективность его работы. Изменение отражения в ближней инфракрасной области (R800) является следствием структурных изменений, связанных с размерами клеток эпидермиса, наличием кутикулы и опушения.

Отмечена тенденция к увеличению индекса фотохимической активности фотосинтетического аппарата PRI для варианта AFI-4000: он был выше на 38% по сравнению с AFI-3000 и на 29% относительно AFI-5000. Величина PRI определяется интенсивностью тепловой диссипации и тесно связана с параметрами флуоресценции, характеризующими нефотохимическое тушение.

Коэффициент пропускания света листовой поверхностью. Наибольший коэффициент пропускания света листом был характерен для варианта AFI-4000 — $K_T = 0.075 \pm 0.011$. Он достоверно

отличался на 20% от $K_T = 0.062 \pm 0.003$, полученного для листовой поверхности редиса, освещаемого источником AFI-5000, и в виде тенденции на 12% от значения $K_T = 0.067 \pm 0.006$, измеренного для варианта AFI-3000. Можно сделать вывод, что листья редиса, выращенные с использованием светильников AFI-5000, поглощали большее количество света, чем листья, облучаемые в процессы развития AFI-3000 и AFI-4000.

Электрофизиологические показатели. Динамика формирования разности потенциалов в корнеобитаемой среде редиса была схожа для всех вариантов (рис. 4): рост напряжения в первые два дня, затем стабилизация на среднем уровне 394 ± 23 мВ для AFI-5000, 396 ± 21 мВ для AFI-4000 и 374 ± 23 мВ для AFI-3000 до десятого дня вегетационного периода. После этого для вариантов AFI-5000 и AFI-4000 наблюдался рост разности потенциалов до 424 ± 34 мВ и 403 ± 29 мВ соответственно. При этом для AFI-3000 напряжение, наоборот, спадало до значений 283 ± 59 мВ. Вероятно, период с 10 по 20 дни соответствовал активному росту корнеплода и связанными с этим интенсивными метаболическими процессами в корнеобитаемой среде, на которые, видимо, положительным образом влияет большая доля синего света в спектре освещения. После 21 дня для всех вариантов наблюдалось уменьшение интенсивности генерации разности потенциалов, что может говорить о снижении роли концентрационных эффектов и замедлении процессов распределения питательных веществ по градиенту глубины торфа в связи с усилением физиологических процессов накопления биомассы корнеплодов.

Интересно отметить, что водородный показатель pH составлял для AFI-5000 в области верхнего электрода — 7.19, нижнего электрода —

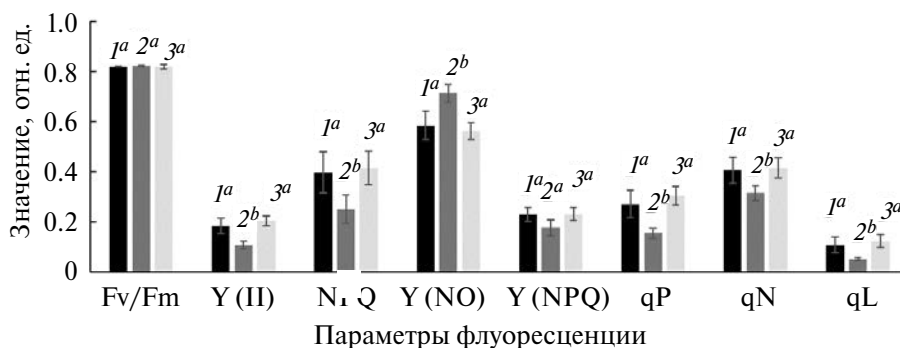


Рис. 2. Параметры флуоресценции при выращивании редиса с использованием источников света различного спектрального состава: 1 — AFI-3000, 2 — AFI-4000, 3 — AFI-5000. Fv/Fm — максимальный фотохимический выход ФС II; Y(II) — эффективный фотохимический выход ФС II; qP — коэффициент фотохимического тушения флуоресценции на свету; qL — коэффициент фотохимического тушения флуоресценции в случае взаимосвязанных антенн ФС II; qN — коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции; NPQ — коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции, рассчитываемый согласно уравнению Штерна-Фольмера; Y(NO) — нерегулируемые потери энергии возбуждения; Y(NPQ) — регулируемые потери энергии возбуждения за счет диссипации тепла с участием ДрН- и зеаксантин-зависимых механизмов.

7.30, для AFI-4000 в области верхнего электрода — 7.36 и нижнего — 7.42, тогда как для AFI-3000 эти показатели практически не отличались и составляли 7.51 для верхней области и 7.47 для нижней. Это может свидетельствовать о том, что в формировании разности потенциалов в корнеобитаемой среде участвуют окислительно-восстановительные процессы, сопутствующие жизнедеятельности растений и окружающей их микрофлоры, вследствие которых возникает градиент концентраций. В данном случае, в вариантах AFI-5000 и AFI-4000 в области верхнего электрода присутствует большее количество ионов водорода по сравнению с нижним, а для AFI-3000 различий концентраций не наблюдается, что может быть одной из причин формирования более низкой разности потенциалов.

В целом, максимальная генерация напряжения 532 мВ наблюдалась в корнеобитаемой

среде редиса, освещаемого в процессе роста светильниками AFI-5000, для AFI-4000 эта величина составила 508 мВ, а для AFI-3000 — 439 мВ. Среднее значение в течение всего вегетационного периода составило 384 ± 58 мВ для AFI-5000, 385 ± 47 мВ для AFI-4000 и 314 ± 65 мВ для AFI-3000.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные комплексные исследования выявили достоверное увеличение массы и размеров корнеплодов, содержания сухого вещества и фотосинтетических пигментов, увеличение содержания макро- и микроэлементов в листьях (кальция, фосфора, цинка, марганца, меди) и корнеплодах (калия, железа, цинка, марганца), уменьшение количества нитратов, повышение коэффициентов эффективного фотохимического выхода, фотохимического и нефотохимического тушения флуоресценции, а также показали высокую генерацию разности потенциалов в корнеобитаемой среде для растений редиса, освещаемых в процессе роста источником света AFI-5000 со спектром, близким к солнечному свету в полдень, с соотношением синего : зеленого : красного диапазонов 25% : 38% : 37% по сравнению с другими исследованными вариантами. Для растений редиса, выращенных с использованием светодиодных светильников AFI-3000 со спектральным составом в видимой области, приближенным к естественному свету, когда солнце находится у горизонта, с отношением основных диапазонов спектра 11% : 35% : 54%, отмечено увеличение количества сахаров, но при этом наблюдалось также накопление нитратов и высокая доля рассеяния света листом. Светодиодные светильники AFI-4000 с наиболее нейтральным освещением, приближенным к утреннему и послеобеденному свету, с

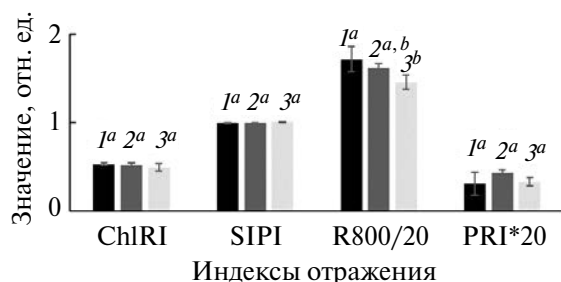


Рис. 3. Индексы отражения при выращивании редиса с использованием источников света различного спектрального состава: 1 — AFI-3000, 2 — AFI-4000, 3 — AFI-5000. ChlRI — индекс отражения хлорофилла; SIPI — отношение суммы каротиноидов к сумме хлорофиллов; R800/20 — индекс интенсивности рассеяния света, разделенный на 20 отн. ед. для масштаба; PRI*20 — индекс фотохимической активности фотосинтетического аппарата, умноженный на 20 отн. ед. для масштаба.

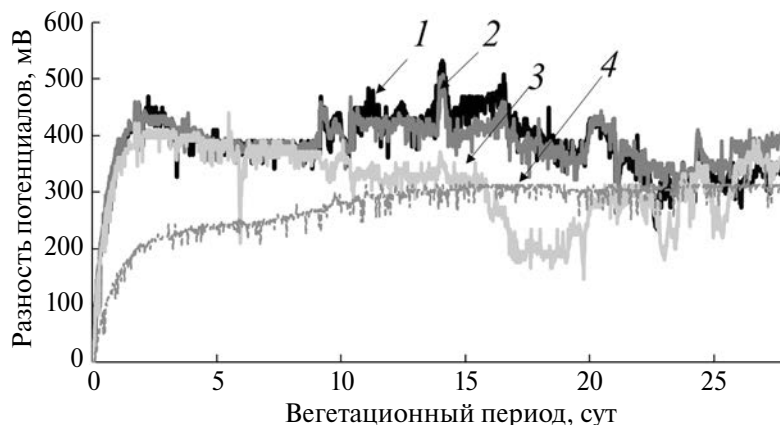


Рис. 4. Формирование разности потенциалов в корнеобитаемой среде редиса в процессе его выращивания с использованием источников света различного спектрального состава: 1 — AFI-5000, 2 — AFI-4000, 3 — AFI-3000, 4 — контроль без растения.

соотношением областей спектра 19%:38%:43% показали наихудший результат из исследованных вариантов — повышенные нерегулируемые потери энергии возбуждения и пропускание света листовой поверхностью.

На основе полученных данных была составлена сводная таблица, в которой представлены все достоверно отличавшиеся показатели (табл. 5). Им были присвоены баллы — 1.0 для варианта с минимальным параметром, к двум другим добавлен тот процент от балла, на который данный показатель отличался от варианта с наименьшим показателем. Для содержания нитратов, коэффициента нерегулируемых потерь энергии возбуждения, индекса рассеяния света и коэффициента пропускания света разница в значениях вычиталась из 1.0, так как увеличенные значения этих параметров связаны с негативным воздействием внешних факторов на состояние растений. Полученная сумма баллов для исследованных вариантов была следующей: AFI-3000 — 19.9, AFI-4000 — 18.2, AFI-5000 —

22.1 балл, что подтверждает наибольшее положительное влияние на растения редиса источника света с наиболее равномерным распределением энергии фотонов по диапазонам спектра и большей долей синего света по отношению к другим использованным светильникам.

Наши результаты согласуются с данными, полученными другими исследователями. Так, спектр излучения, приближенный к солнечному, положительно влияет на растения, увеличивая их продуктивность за счет формирования большей площади листа и эффективного усвоения энергии света [24]. Увеличение доли синего света в спектре способствует изменению фотосинтетических характеристик (фотосинтетического потенциала, скорости фотосинтеза, числа и размеров устьиц) и стимулирует физиологические реакции у салата, в результате чего наблюдается увеличение сухой биомассы, числа листьев и площади листовой поверхности [46]. Увеличение доли зеленого и снижение доли синего света в спектре вызывает вытягивание рас-

Таблица 5. Сводные результаты, сравнивающие различия в процентном соотношении между исследованными фотосинтетическими, электро- и морфофизиологическими показателями редиса, освещаемого в процессе роста источниками света с разным спектральным составом

Параметр	Балл		
	Светодиодный светильник AFI-3000	Светодиодный светильник AFI-4000	Светодиодный светильник AFI-5000
Индекс хозяйственной эффективности	1.0	1.0	1.1
Индекс аттракции	1.0	1.0	1.3
Длина черешка	1.0	1.2	1.0
Диаметр корнеплода	1.1	1.0	1.2
Сухое вещество листьев	1.0	1.1	1.1
Сумма хлорофиллов <i>a</i> и <i>b</i>	1.0	1.1	1.2
Каротиноиды	1.0	1.0	1.1
Сухое вещество	1.2	1.0	1.3
Нитраты	0.6	0.7	1.0
Сумма сахаров	1.5	1.0	1.3
Эффективный фотохимический выход ФС II Y (II)	1.7	1.0	1.9
Нерегулируемые потери энергии возбуждения Y (NO)	1.0	0.8	1.0
Коэффициент фотохимического тушения флуоресценции на свету qP	1.8	1.0	1.9
Коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции qN	1.3	1.0	1.3
Индекс интенсивности рассеяния света R800	0.8	0.9	1.0
Коэффициент пропускания света K _T	0.9	1.0	0.8
Средняя разность потенциалов в корнеобитаемой среде	1.0	1.2	1.2
Максимальная разность потенциалов в корнеобитаемой среде	1.0	1.2	1.2
Итого	19.9	18.2	22.1

тений, а также приводит к снижению их сырой и сухой биомассы [47]. Добавление синего света (от 25 до 50% в спектре) достоверно повышает урожай и содержание макро- и микроэлементов у микрозелени сем. Brassicaceae – горчицы и кейла [48]. Синий свет стимулирует рост растений редиса, шпината и салата, существенно повышая биомассу растений, включая как надземную часть, так и корнеплод, а также способствует значительному увеличению содержания общего хлорофилла [49].

Таким образом, наши исследования показали, что применение источника света со спектром, приближенным к солнечному свету в полдень с цветовой температурой 5000 К, по сравнению со светильником с цветовой температурой 3000 К, спектр которого приближен к естественному свету, когда солнце находится у горизонта, и с цветовой температурой 4000 К с наиболее нейтральным освещением, приближенным к утреннему и послеобеденному свету, способствовало получению более высоких показателей, характеризующих активность и эффективность работы фотосинтетического аппарата и интенсивность физико-химических процессов в корнеобитаемой среде, что, в конечном итоге, обеспечило максимальный выход растительной продукции в данном варианте 5000 К. Вероятно, этот положительный эффект связан с наличием в спектре большей доли синего света, влияющего на развитие корневой системы.

В целом, светодиодные светильники, имитирующие солнечный свет, можно рассматривать как перспективный источник света для управляемого экологичного сельского хозяйства, в том числе для применения в территориально удаленных районах. Однако следует заметить, что разные культуры по-разному реагируют на спектральный состав световой среды, поэтому расширение объема исследований реакции растений на спектральный состав применяемых источников света необходимо для увеличения эффективности производства растительной продукции в контролируемых условиях среды и повышения ее качества.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда согласно соглашению № 23-26-10050 от 20.04.2023 г. и Санкт-Петербургского научного фонда в соответствии с соглашением № 23-26-10050 от 05.05.2023 г., грант № 23-26-10050.

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

Авторы Т.Э. Кулешова и Н.Г. Синявина придумали и провели эксперимент, В.Е. Вертебный,

Ю.В. Хомяков осуществили биохимические исследования, Е.М. Эзерина фотосинтетические измерения, Н.Г. Синявина и А.А. Кочетов морфометрические измерения, Т.Э. Кулешова и П.В. Желначева электрические измерения. Т.Э. Кулешова, Г.Г. Панова, А.А. Кочетов и Н.Г. Синявина участвовали в обработке и анализе данных. Авторы Т.Э. Кулешова, Е.М. Эзерина и Н.Г. Синявина участвовали в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Naikoo N.B., Kanth R.H., Bahar F.A., Bhat M.A., Nazir A., Mahdi S.S., Amin Z., Singh L., Raja W., Saad A.A., Bhat T.A., Palmo T., Ahngar T.A. Vertical farming: The future of agriculture: A review // *Pharma Innovation*. 2022. V. 11. P. 1175.
2. Kozai T., Niu G. Role of the plant factory with artificial lighting (PFAL) in urban areas // *Plant Factory* / Eds. Kozai T. et al. Burlington: Academic Press, 2020. P. 7.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816691-8.00002-9>
3. Goto E. Plant production in a closed plant factory with artificial lighting // *Acta Hort.* 2012. V. 956. P. 37.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.956.2>
4. Kozai T., Niu G., Takagaki M. *Plant Factory: an Indoor Vertical Farming System for Efficient Quality Food Production*. Cambridge, UK: Academic Press, 2019. 487 p.
5. Панова Г.Г., Черноусов И.Н., Удалова О.Р., Александров А.В., Карманов И.В., Аникина Л.М., Судачков В.Л., Якушев В.П. Научно-технические основы круглогодичного получения высоких урожаев качественной растительной продукции при искусственном освещении // Докл. РАСХН. Т. 4. С. 17.
6. Csambalik L., Diveky-Ertsey A., Gal I., Madaras K., Sipos L., Szekely G., Pusztai P. Sustainability perspectives of organic farming and plant factory systems – from divergences towards synergies // *Horticulturae*. 2023. V. 9. P. 895.
<https://doi.org/10.3390/horticulturae9080895>
7. Wong C. E., Teo Z. W. N., Shen L., Yu H. Seeing the lights for leafy greens in indoor vertical farming // *Trends Food Sci. Technol.* 2020. V. 106. P. 48.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.031>
8. Samantara K., Bohra A., Mohapatra S.R., Prihatini R., Asibe F., Singh L., Reyes V.P., Tiwari A., Maurya A.K., Croser J.S., Wani S.H., Siddique K.H.M., Varshney R.K. Breeding more crops in less time: a perspective on speed breeding // *Biology*. 2022. V. 11. P. 275.
<https://doi.org/10.3390/biology11020275>
9. Kochetov A.A., Mirskaya G.V., Sinyavina N.G., Egorova K.V. Transgressive breeding: A methodology for accelerated creation of new forms of plants with a predictable complex of economically valuable traits // *Russ. Agric. Sci.* 2021. V. 47. P. 40.
<https://doi.org/10.3103/S1068367422010050>

10. Ермаков Е.И., Черноусов И.Н. Регулируемая агроэкосистема как основа изучения и управления продукционным процессом растений // Матер. Всерос. конф. "Управление продукционным процессом растений в регулируемых условиях". Санкт-Петербург: АФИ, 1996. С. 14.
11. Paradiso R., Proietti S. Light-quality manipulation to control plant growth and photomorphogenesis in greenhouse horticulture: The state of the art and the opportunities of modern LED systems // J. Plant Growth Regul. 2022. V. 41. P. 742. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10337-y>
12. Кулешова Т.Э., Удалова О.Р., Балашова И.Т., Аникина Л.М., Конончук П.Ю., Мирская Г.В., Дубовицкая В.И., Вертебный В.Е., Хомяков Ю.В., Панова Г.Г. Особенности влияния спектра излучения на продуктивность и биохимический состав тестовых плодовых и листовых овощных культур // Журн. техн. физ. 2022. Т. 92. С. 1060. <https://doi.org/10.21883/JTF.2022.07.52663.343-21>
13. Протасова Н.Н. Светокультура как способ выявления потенциальной продуктивности растений // Физиология растений. 1987. Т. 34. С. 812.
14. Тихомиров А.А., Шарупич В.П., Лисовский Г.М. Светокультура растений: биофизические и биотехнологические основы. Новосибирск, 2000. 213 с.
15. Avercheva O.V., Berkovich Y.A., Erokhin A.N., Zhigalova T.V., Pogosyan S.I., Smolyanina S.O. Growth and photosynthesis of Chinese cabbage plants grown under light-emitting diode-based light source // Russ. J. Plant Physiol. 2009. V. 56. P. 14. <https://doi.org/10.1134/S1021443709010038>
16. Прикупец Л.Б., Боос Г.В., Терехов В.Г., Тараканов И.Г. Исследование влияния излучения в различных диапазонах области ФАР на продуктивность и биохимический состав биомассы салатно-зеленных культур // Светотехника. 2018. Т. 5. С. 6.
17. Wu B.S., Hitti Y., MacPherson S., Orsat V., Lefsrud M.G. Comparison and perspective of conventional and LED lighting for photobiology and industry applications // Environ. Exp. Bot. 2020. V. 171. P. 103953. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103953>
18. Кулешова Т.Э., Удалова О.Р., Балашова И.Т., Аникина Л.М., Конончук П.Ю., Мирская Г.В., Панова Г.Г. Влияние различных источников света на продукционный процесс томата в интенсивной светокультуре // Овощи России. 2021. Т. 4. С. 65. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2021-4-65-70>
19. Santin M., Ranieri A., Castagna A. Anything new under the sun? An update on modulation of bioactive compounds by different wavelengths in agricultural plants // Plants. 2021. V. 10. P. 1485. <https://doi.org/10.3390/plants10071485>
20. Tang Y., Jia M., Mei Y., Yu Y., Zhang J., Tang R., Song K. 3D intelligent supplement light illumination using hybrid sunlight and LED for greenhouse plants // Optik. 2019. V. 183. P. 367. <https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2019.02.002>
21. Zhuo Y., Zhu H., Shen C., Sun G., Liu J.G. Violet chip excited white LEDs for sun-like lighting and horticulture lighting // Proc. 16th China International Forum on Solid State Lighting & International Forum on Wide Bandgap Semiconductors (25–27 November 2019). China, Shenzhen). 2019. P. 85. <https://doi.org/10.1109/SSLChinaIFWS49075.2019.9019777>
22. Massa G.D., Kim H.H., Wheeler R.M., Mitchell C.A. Plant productivity in response to LED lighting // HortScience. 2008. V. 43. P. 1951. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.7.1951>
23. Menendez-Velazquez A., Morales D., Garcia-Delgado A.B. Sunlike white light-emitting diodes based on rare-earth-free luminescent materials // Materials. 2022. V. 15. P. 1680. <https://doi.org/10.3390/ma15051680>
24. Jie Z., Cheng-bo Z., Hong X., Rui-feng C., Qi-chang Y., Tao L. The effect of artificial solar spectrum on growth of cucumber and lettuce under controlled environment // J. Integr. Agric. 2020. V. 19. P. 2027. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63209-9](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63209-9)
25. Романенко С.А., Туранов С.Б. Исследование влияния спектрального состава облучения на рост и развитие тепличного редиса // Матер. XIII Всерос. науч.-техн. конф. с междунар. участием в рамках IV Всерос. светотехнического форума с междунар. участием. Саранск, 2017. С. 284.
26. Miler N., Kulus D., Wozny A., Rymarz D., Hajzer M., Wierzbowski K., Nelke R., Szeffs L. Application of wide-spectrum light-emitting diodes in micropropagation of popular ornamental plant species: A study on plant quality and cost reduction // In Vitro Cell. Dev. Biol.— Plant. 2019. V. 55. P. 99. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9939-5>
27. Sinyavina N.G., Kochetov A.A., Kocherina N.V., Egorova K.V., Kurina A.B., Panova G.G., Chesnokov Y.V. Breeding approaches for controlled conditions of artificial light culture for small radish and radish (*Raphanus sativus* L.) // Horticulturae. 2023. V. 9. P. 678. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9060678>
28. Кочетов А.А., Синявина Н.Г. РФ Патент 11518, 2021.
29. Panova G.G., Udalova O.R., Kanash E.V., Galushko A.S., Kochetov A.A., Priyatkin N.S., Arkhipov M.V., Chernousov I.N. Fundamentals of physical modeling of "ideal" agroecosystems // Tech. Phys. 2020. V. 65. P. 1563. <https://doi.org/10.1134/S1063784220100163>
30. King D.L., Kratochvil J.A., Boyson W.E. Measuring solar spectral and angle-of-incidence effects on photovoltaic modules and solar irradiance sensors // Conf. Rec. 26th IEEE Photovoltaic Specialists Conference. USA, CA, Anaheim, 1997. P. 1113. <https://doi.org/10.1109/PVSC.1997.654283>
31. Ермаков А.И. Методы биохимического исследования растений. Л.: Агропромиздат, 1987. 429 с.
32. Методические указания по определению нитратов и нитритов в продукции растениеводства. М.: МЗ РСФСР, 1990. 49 с.

33. Скурихин И.М., Тутельян В.А. Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов. Москва: Изд-во Медицина, 1998. 342 с.
34. ПНД Ф 16.2.2:2.3.71-2011. Количественный химический анализ почв. Методика измерений массовых долей металлов в осадках сточных вод, донных отложениях, образцах растительного происхождения спектральными методами. ФБУ ФЦАО, 2011. 45 с. <https://gostrf.com/normadata/1/4293793/4293793107.htm?ysclid=lox20vb89u875180587>
35. Sims D.A., Gamon J.A. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages // *Remote Sens. Environ.* 2002. V. 81. P. 337. [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(02\)00010-X](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(02)00010-X)
36. Penuelas J., Barret F., Filella I. The reflectance at the 950–970 nm region as an indicator of plant water status // *Int. J. Remote Sens.* 1993. V. 14. P. 1887. <https://doi.org/10.1080/01431169308954010>
37. Gamon J.A., Serrano L., Surfus J.S. The photochemical reflectance index: an optical indicator of photosynthetic radiation use efficiency across species, functional types, and nutrient levels // *Physiol. Comp. Oecol.* 1997. V. 112. P. 492. <https://doi.org/10.1007/s004420050337>
38. MINI-PAM Photosynthesis Yield Analyzer Manual. Edition 3, Heinz Walz GmbH, 2018. 197 p.
39. Kitajima M., Butler W.L. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone // *BBA, Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1975. V. 376. P. 105. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(75\)90209-1](https://doi.org/10.1016/0005-2728(75)90209-1)
40. Genty B., Briantais J.M., Baker N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence // *BBA, Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* 1989. V. 990. P. 87. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(89\)80016-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(89)80016-9)
41. Schreiber U., Schliwa U., Bilger W. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer // *Photosynth. Res.* 1986. V. 10. P. 51. <https://doi.org/10.1007/BF00024185>
42. Kramer D.M., Johnson G., Kiirats O., Edwards G.E. New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes // *Photosynth. Res.* 2004. V. 79. P. 209. <https://doi.org/10.1023/B:PRES.0000015391.99477.0d>
43. Bilger W., Bjorkman O. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis* // *Photosynth. Res.* 1990. V. 25. P. 173. <https://doi.org/10.1007/BF00033159>
44. Genty B., Harbinson J., Cailly A.L., Rizza F. Fate of excitation at PS II in leaves: the non-photochemical side // Proc. 3rd BBSRC Robert Hill Symposium on Photosynthesis (March 31 – April 3, 1996), University of Sheffield, Western Bank, Sheffield, UK. Abstract P28.
45. Kuleshova T.E., Bushlyakova A.V., Gall N.R. Noninvasive measurement of bioelectric potentials of plants // *Tech. Phys. Lett.* V. 45. P. 190. <https://doi.org/10.21883/10.1134/S1063785019030106>
46. Wang J., Lu W., Tong Y., Yang Q. Leaf morphology, photosynthetic performance, chlorophyll fluorescence, stomatal development of lettuce (*Lactuca sativa* L.) exposed to different ratios of red light to blue light // *Front. Recent Dev. Plant Sci.* 2016. V. 7. P. 64. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00250>
47. Наконечная О.В., Холин А.С., Субботин Е.П., Бурковская, Е.В., Хроленко Ю.А., Гафицкая И.В., Орловская И.Ю., Бурдуковский, М.Л., Михеева А.В., Кульчин Ю.Н. Влияние светодиодного освещения разного спектра на развитие салата листового (*Lactuca sativa*) // *Изв. РАН. Сер. биол.* 2023. Т. 3. С. 278. <https://doi.org/10.31857/S1026347022600406>
48. Brazaityte A., Miliauskiene J., Vastakaitė-Kairiene V., Sutuliene R., Lauzike K., Duchovskis P., Malek S. Effect of different ratios of blue and red led light on Brassicaceae microgreens under a controlled environment // *Plants.* 2021. V. 10. P. 801. <https://doi.org/10.3390/plants10040801>
49. Yorio N.C., Goins G.D., Kagie H.R., Wheeler R.M., Sager J.C. Improving spinach, radish, and lettuce growth under red light-emitting diodes (LEDs) with blue light supplementation // *HortScience.* 2001. V. 36. P. 380. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.36.2.380>