

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
СТАТЬИ

УДК 581.1

**МУТАНТ *Arabidopsis thaliana* СО ВСТАВКОЙ Т-ДНК В ПРОМОТОРЕ ГЕНА *Flot1* (At5g25250) ОБЛАДАЕТ ПОВЫШЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К NaCl**

© 2020 г. Л. А. Халилова<sup>а</sup>, О. В. Сергиенко<sup>а</sup>, Ю. В. Орлова<sup>а</sup>,  
Н. А. Мясоедов<sup>а</sup>, И. В. Карпычев<sup>а</sup>, Ю. В. Балнокин<sup>а</sup>, \*

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

\*e-mail: balnokin@mail.ru

Поступила в редакцию 08.07.2019 г.

После доработки 26.08.2019 г.

Принята к публикации 28.08.2019 г.

Мембранные белки флотиллины вовлечены во множество клеточных процессов и физиологических функций. Однако их участие в процессах, определяющих устойчивость растений к стрессовым воздействиям, остается малоизученным. В настоящей работе у *Arabidopsis thaliana* исследовали возможное вовлечение флотиллина Flot1 в Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> гомеостатирование клеток в условиях засоления среды хлористым натрием. С этой целью в корнях и листьях растений дикого типа (ДТ) и мутанта *flot1*, имеющего вставку Т-ДНК в промоторе, анализировали транскрипцию гена *Flot1* методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени с обратной транскрипцией (кОТ-ПЦР). Наряду с этим, исследовали мутантный фенотип (рост, содержание ионов Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> в органах, ультраструктуру клеток корня) в нормальных условиях и в присутствии 100 мМ NaCl в среде культивирования. Мутация привела к активированию экспрессии *AtFlot1*, что было более заметно в корнях при засолении. У мутантов в этих условиях масса органов была больше, содержание в них Na<sup>+</sup> ниже, а содержание K<sup>+</sup> выше, чем у ДТ. Исследование ультраструктуры клеток корня *A. thaliana* продемонстрировало у мутантных растений более интенсивное, по сравнению с ДТ, формирование в цитоплазме пост-Гольджи везикул и мультивезикулярных тел (МВТ). У мутантных растений и растений ДТ наличие хлористого натрия в питательном растворе приводило к стимуляции образования в цитоплазме МВТ и микровакуолей, слиянию последних в более крупные структуры. Предполагается, что изменения в ультраструктуре клеток корня, вызванные мутацией и засолением, отражают стимуляцию, соответственно, везикулярного трафика и биогенеза вакуолей – процессов, участвующих в поддержании Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> гомеостаза клеток.

**Ключевые слова:** *Arabidopsis thaliana*, ген *Flot1*, мутация, анализ транскрипции, фенотип, солеустойчивость

DOI: 10.31857/S0015330320020074

ВВЕДЕНИЕ

Важную роль в устойчивости растений к биогенным и абиогенным стресс-факторам отводят мембранным белкам флотиллинам [1]. Геном *Arabidopsis thaliana* содержит три кодирующие области гомологов флотиллинов (At5g25250, At5g25260, и At5g64870), названных, соответственно, *AtFlot1*, *AtFlot2* и *AtFlot3* [1]. Флотиллины являются членами большого суперсемейства белков, несущих SPFH (stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C) домен.

Это суперсемейство состоит из нескольких типов белков, выполняющих различные функции. Его представители обнаружены у организмов всех царств. В растениях оно представлено прогибитами, флотиллинами, стоматинами, эрлинами и уникальными для растений белками, индуцирующими реакцию сверхчувствительности (HIRs) в ответ на внедрение патогенов [2].

Флотиллины являются компонентами микро-/нанодоменов (НД) плазмалеммы и эндосомальных структур [3, 4]. По химическому составу и свойствам НД отличаются от своего окружения и мембране. Они обогащены стеринами, сфинголипидами, насыщенными фосфолипидами и содержат глюкозилфосфатидилинозитол (GPI)-заякоренные и интегральные белки [3]. НД отождествляют [1] с описанными ранее липидными рафтами

**Сокращения:** АТ – аутофагическое тело; АФ – аутофагосома; ВТ – везикулярный транспорт; ДТ – дикий тип; КГ – комплекс Гольджи; МВ – микровакуоль; МВТ – мультивезикулярное тело; МС – среда Мурашиге-Скуга; НД – нанодомен; ПР – питательный раствор; ТГС/РЭ – транс-Гольджи сеть/ранние эндосомы; ЭР – эндоплазматический ретикулум.

мембран [5]. На клетках животных показано, что НД эндосом функционируют как “распределяющие (sorting) платформы” для белков, доставляемых к плазмалемме (ПМ) [6].

Находясь в составе НД, флотиллины выполняют множество функций. В клетках млекопитающих они участвуют в сигналинге, эндоцитозе и экзоцитозе, контроле везикулярного трафика белков и межклеточных коммуникациях, а также во взаимодействии с патогенными микроорганизмами и в канцерогенезе [7–10]. Хотя функции флотиллинов у растений исследованы в значительно меньшей степени, чем у представителей других царств, их участие в ряде процессов тоже было показано. В частности, продемонстрировано вовлечение флотиллинов в эндоцитоз растительных клеток [11], во взаимодействие бобовых растений с ризобиями [12] и в ответ растений на инфицирование патогенными бактериями [13].

Эндосомальный транспорт с участием флотиллинов определяют как клатрин-независимый эндоцитозный путь. Эндоцитозные везикулы, образовавшиеся из плазмалеммы клеток корней *A. thaliana*, содержали Flot1 и отличались по размерам и подвижности от клатрин-содержащих везикул [11]. Представление о важной роли флотиллинов в эндосомальном транспорте у растений подкрепляется способностью флотиллинов взаимодействовать с белками, которые являются непосредственными исполнителями или регуляторами эндоцитоза, такими, например, как SYP131 (субъединица SNARE) и GB2 (Rab5 ГТФаза), или подвергаются эндоцитозу и переносятся посредством везикул, не будучи при этом непосредственно вовлечены в его механизм, например, аквапорины [1, 14]. Крайне мало информации имеется об участии флотиллинов в процессах, лежащих в основе устойчивости растений к стрессовым факторам абиотической природы. Тем не менее их вовлечение в эти процессы представляется весьма вероятным, поскольку ряд белков, переносимых везикулами, прямо или косвенно участвует в ответе растений на стрессовые воздействия, в частности, на солевой стресс и дегидратацию. К таким белкам относятся рецептор-подобные киназы, белок MAP-киназного каскада MAPKKK, Ca<sup>2+</sup>-связывающие белки, ионные транспортеры, H<sup>+</sup>-АТФаза плазмалеммы; белки, индуцируемые осмотическим шоком; аквапорины [1, 14].

Недавно была исследована роль флотиллинов в ответной реакции растений *A. thaliana* на ряд стрессовых факторов путем измерения и сравнения экспрессии *AtFlot1*, *AtFlot2* и *AtFlot3* в нормальных и стрессовых условиях, в частности, при высокой солености, низкой температуре, азотом и фосфорном голодании, инфицировании растений патогенной бактерией *Pseudomonas syringae* и некротрофным грибом *Botrytis cinerea*,

при действии элиситоров flg22 и elf18 и фитогормонов, 1-нафталин уксусной и абсцизовой кислот [15]. Результаты этих экспериментов подтвердили участие флотиллинов в ответной реакции *A. thaliana* на разные стрессовые воздействия биотической и абиотической природы.

Цель работы – исследование возможной роли флотиллина *AtFlot1* в Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> гомеостатировании клеток *A. thaliana* в условиях засоления. Для этого мы определяли содержание транскриптов гена *AtFlot1* у ДТ и его инсерционного мутанта *Atflot1*, имеющего вставку в промоторе, а также исследовали мутантный фенотип (рост, содержание ионов Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> в органах, ультраструктуру клеток корня) в нормальных условиях и в присутствии 100 мМ NaCl в среде культивирования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Растительный материал и выращивание растений.** Работу выполняли на растениях *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (экотип Col-0) дикого типа (ДТ) и его инсерционном мутанте *flot1* (CS444812 GK). Вставка находится в промоторе гена *AtFlot1* (согласно информации на [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)). Все эксперименты, за исключением исследования ультраструктуры клеток, проводили на растениях, выращенных в условиях водной культуры. Семена проращивали на агаризованной среде, приготовленной на 33% питательном растворе (ПР) Хогланда при температуре 23 ± 2°C, относительной влажности воздуха 70 ± 5%, фотопериоде 16 ч в сутки и интенсивности света 80 мкмоль квантов/(м<sup>2</sup> с), полученного от люминесцентных ламп ЛБ-80 (Россия). Проростки 15-дневного возраста переносили на жидкий 50% питательный раствор Хогланда, который барботировали воздухом. Остальные условия выращивания растений на жидком ПР были такими же, как при проращивании семян. В вариантах с засолением через 10 суток после перенесения растений на жидкие ПР в них вносили NaCl до конечных концентраций 50 или 100 мМ. Смену ПР осуществляли еженедельно. Измерения массы органов, содержания в них ионов и исследование экспрессии *AtFlot1* проводили на растениях 45-дневного возраста. Для исследования ультраструктуры клеток корня использовали 4-дневные проростки, выращенные на агаризованной 50% питательной среде Мурасиге-Скуга, содержащей 1% сахарозу, с добавлением или без добавления 100 мМ NaCl. Температурный и световой режимы были такими же, как для водной культуры.

**Определение содержания Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> в органах растений.** Высушенные при 90°C органы растений измельчали. Ионы из образцов извлекали кипячением в течение 2 мин, затем экстракт фильтровали. Концентрацию Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> в фильтрах

**Таблица 1.** Последовательность праймеров для выявления растений гомозиготных по мутантной аллели *Atflot1* и для количественной ОТ – ПЦР в реальном времени

Название	Последовательность	Эксперимент
FLot1mut	CTTAAACTCCTTTGTCCCTTCAAA	Выявление растений, гомозиготных по мутантной аллели <i>Atflot1</i>
LB-GK	CCCATTGGACGTGAATGTAGACAC	
Flot1f	GCAGCCACTTTGTAATAAATCA	Выявление растений, гомозиготных по аллели <i>AtFlot1</i> дикого типа
Flot1r	TCAACCTAGCATACAAAATCAGCG	
FlotRT_F	GGAACCGAAGCAAGTGACTC	Количественная ОТ-ПЦР в реальном времени для гена <i>Atflot1</i>
FlotRT_R	TTCGCATGGATGTTCAACCAC	
ACT2F	CTTGCACCAAGCAGCATGAA	Количественная ОТ-ПЦР в реальном времени для гена <i>ACT2</i>
ACT2R	CCGATCCAGACACTGTACTTCCTT	

определяли с помощью пламенного фотометра ФПА-2-01 (ОАО “ЗОМЗ”, Россия).

**Исследование ультраструктуры клеток корней проростков.** Ультраструктуру клеток эпидермы и коры корней проростков *A. thaliana* мутанта и ДТ проводили с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Образцы подготавливали в соответствии со стандартной методикой [16]. Срезы на сеточках контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе LIBRA 120 (“Carl Zeiss”, Германия). Площади органелл на срезах определяли с помощью программы ZEN-2012 Microsoft, используя инструмент “контур”.

**Выделение геномной ДНК и определение гомозиготности растений.** Геномную ДНК выделяли из листьев методом, приведенным на сайте [http://www.monsanto.com/products/documents/dna-detection/dna\\_im.pdf](http://www.monsanto.com/products/documents/dna-detection/dna_im.pdf). Полученную ДНК использовали в качестве матрицы для выявления гомозиготных растений методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и для амплификации других необходимых фрагментов. Последовательности использованных праймеров приведены в таблице 1. Амплифицированные фрагменты при необходимости секвенировали в ЗАО “Евроген” (Россия).

**Выделение суммарной РНК из *A. thaliana* и синтез первой цепи кДНК.** Суммарную РНК из корней и листьев выделяли фенольным методом. Для дополнительной очистки от примесей фенола выделенную РНК переосаждали тремя объемами этанола, предварительно внося в раствор РНК 1/10 объема 3 М ацетата натрия (рН 5.9). Для проверки целостности препараты РНК анализировали методом электрофореза в неденатурирующем агарозном геле, содержащем бромистый этидий. Примеси геномной ДНК в выделенных препаратах РНК удаляли при помощи ДНКазы I (“Thermo Fisher Scientific”, США) в соответствии с инструкцией изготовителя. Синтез первой цепи кДНК осуществляли на матрице суммарной РНК, используя набор реагентов MMLV RV (“Евроген”, Россия).

### Количественный анализ экспрессии гена *AtFlot1*.

Транскрипцию гена *AtFlot1* в органах *A. thaliana* анализировали путем определения относительного содержания мРНК методом количественной ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией (кОТ-ПЦР) с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I на приборе Light Cycler 96 (“Roche”, США). Праймеры подбирали с помощью программы Light Cycler Probe Design 2.0 (“Roche”, США). Последовательности генов были взяты из базы данных <http://www.arabidopsis.org>. В качестве референсного гена использовали *ACT2*. Программа для амплификации была создана в соответствии с рекомендациями производителя прибора и инструкцией к набору “Готовая смесь для ПЦР qPCRMix-HS SYBR mix” (“Евроген”, Россия), тот же набор использовали для приготовления реакционной смеси. В образец вносили 30 нг матрицы (исходя из количества РНК, взятой для синтеза кДНК). Относительный уровень представленности транскрипта (R) определяли с помощью программы Microsoft Excel по формуле:

$$R = 2^{C(\text{FLOT1}) - C(\text{ACT2})}$$

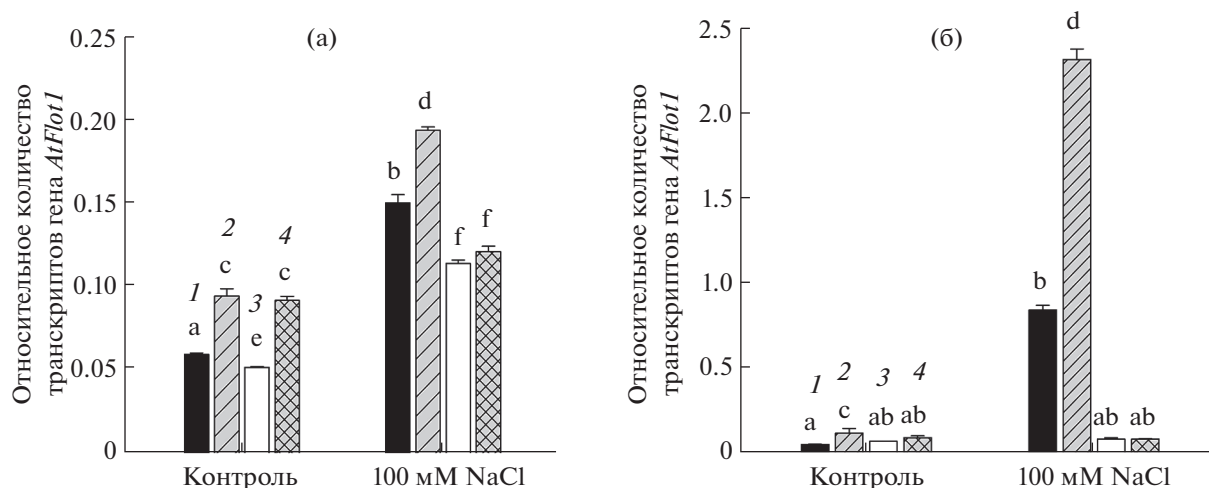
где  $C(\text{GENE})$  – пороговый цикл.

**Статистический анализ.** Статистическую обработку проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA), используя Microsoft Excel 2007. Данные представлены как средние значения и их стандартные ошибки. Разными латинскими буквами обозначены достоверные различия при  $P < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Экспрессия гена *AtFlot1* у мутанта *Atflot1* и растений ДТ

Согласно информации, содержащейся на сайте [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org), мутант *Atflot1* (CS444812GK) получен на основе экотипа Col-0 путем инсерционного мутагенеза, причем вставка Т-ДНК находится в промоторе гена. Секвенирование показало



**Рис. 1.** Экспрессия гена *Flot1* в корнях и листьях 45-дневных растений *A. thaliana* ДТ и инсерционного мутанта *flot1* со вставкой Т-ДНК в промоторе. Растения выращивали на 50% питательном растворе Хогланда, NaCl в конечной концентрации 100 мМ добавляли к ПР за 20 дней (а) или за 8 ч (б) до анализа. Контроль – NaCl не добавляли к ПР. 1 – ДТ, корни; 2 – *Atflot1*, корни; 3 – ДТ, листья; 4 – *Atflot1*, листья. Даны средние значения и их стандартные ошибки ( $n = 3$ ). Разные буквы над столбиками указывают на статистически достоверные различия между средними значениями (ANOVA;  $P < 0.05$ ), одни и те же буквы указывают на отсутствие достоверных различий.

ло, что Т-ДНК расположена в положении –41 п. н. от старта транскрипции. Для проверки наличия вставки была использована ПЦР с геномной ДНК. У отобранных растений обе хромосомы содержали вставку в гене *AtFlot1*, что указывает на гомозиготность растений по мутантному аллелю.

Анализ экспрессии гена *AtFlot1* (At5g25250) проводили на гомозиготных мутантных растениях *Atflot1* (CS444812GК) и растениях ДТ 45-дневного возраста. Влияние хлористого натрия на экспрессию *AtFlot1* исследовали при его длительном и краткосрочном действии на растения. NaCl в конечной концентрации 100 мМ был внесен в ПР в первом случае за 20 суток (рис. 1а), во втором – за 8 ч (рис. 1б) до выделения из растений РНК и проведения анализа. В контрольных вариантах NaCl отсутствовал в ПР.

В случае 20-дневного действия NaCl наблюдалась стимуляция транскрипции *AtFlot1* в корнях и листьях, как мутанта, так и растений ДТ, хотя эффект NaCl, особенно в листьях мутанта, был умеренным (рис. 1а). В случае 8-часового действия соли экспрессия *AtFlot1* в корнях была более чем на порядок выше по сравнению с контролем как у мутантных растений, так и у растений ДТ (рис. 1б). При этом экспрессия *AtFlot1* у первых была заметно выше, чем у вторых. В листьях, однако, и при длительном, и при краткосрочном действии соли уровень экспрессии *AtFlot1* у мутанта и ДТ оставался одинаковым и таким же низким, как в контроле (рис. 1б).

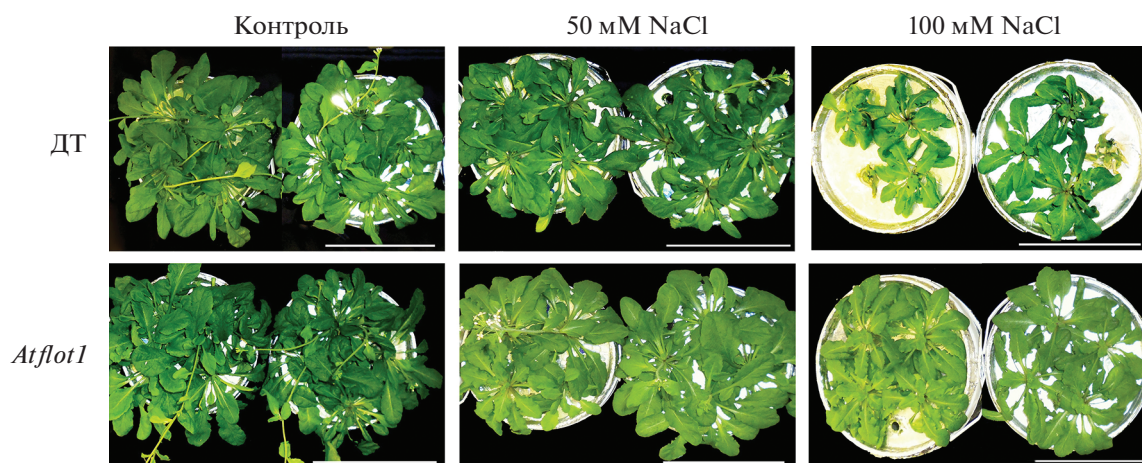
#### Фенотип инсерционного мутанта *Atflot1*

Вызванные мутацией изменения в экспрессии гена *AtFlot1* сопровождалось изменениями в росте

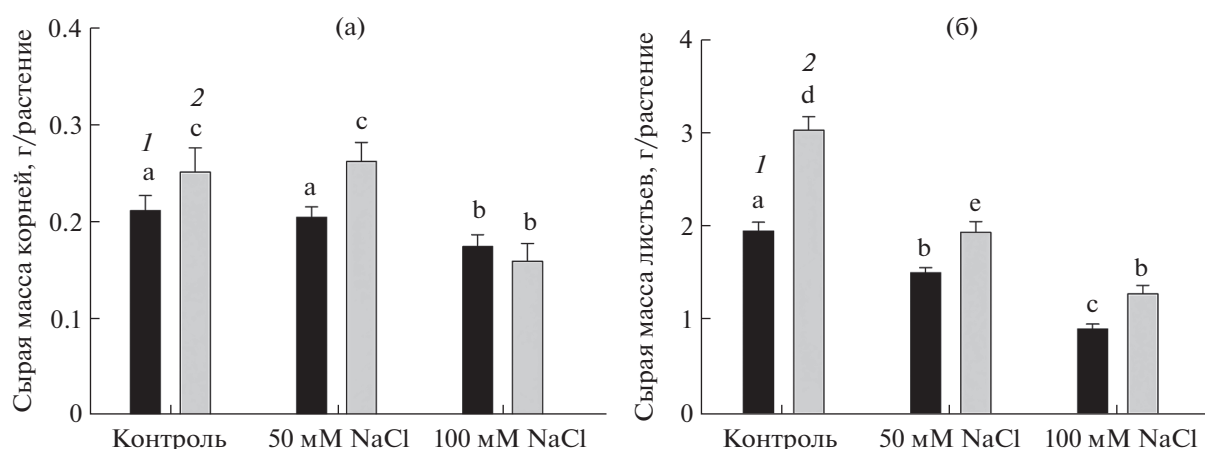
и ионном статусе органов растений, а также в ультраструктуре клеток корня. Измерение массы органов растений и содержания в них ионов  $K^+$  и  $Na^+$  проводили на растениях 45-дневного возраста при 20-дневном действии на растения NaCl. Хлористый натрий приводил к подавлению роста листьев *A. thaliana* (рис. 2). Снижение массы листьев наблюдалось как у растений ДТ, так и мутанта *Atflot1* при концентрациях NaCl в ПР 50 и 100 мМ (рис. 3б). Хлористый натрий в концентрации 100 мМ подавлял рост сильнее, чем 50 мМ NaCl. Достоверное снижение массы корней под действием засоления наблюдалось у мутанта и ДТ при 100 мМ NaCl в ПР (рис. 3а).

Мутация *Atflot1* оказала стимулирующее действие на рост корней (рис. 3а) и листьев (рис. 3б) *A. thaliana*. Вызванное мутацией увеличение массы органов обнаружилось и в контроле, и в условиях засоления при 50 мМ NaCl в ПР. Стимуляция роста листьев у мутанта наблюдалась не только при 50 мМ, но и при 100 мМ NaCl. В целом рост-стимулирующий эффект мутации проявился в большей степени на листьях, чем на корнях.

Как NaCl, так и мутация *Atflot1* оказали влияние на содержание  $K^+$  и  $Na^+$  в корнях и листьях растений (рис. 4). При отсутствии засоления содержание  $K^+$  в органах ДТ и мутанта было одинаковым, ионы  $Na^+$  присутствовали лишь в следовых количествах. Внесение NaCl в ПР привело к снижению содержания  $K^+$  (рис. 4а, 4в) и к резкому возрастанию содержания  $Na^+$  (рис. 4б, 4г) в корнях и листьях как ДТ, так и мутанта. Среднее содержание  $K^+$  в корнях мутанта было выше, чем у ДТ, при концентрациях NaCl в ПР 50 и 100 мМ



**Рис. 2.** Растения *A. thaliana* 45-дневного возраста ДТ и мутанта *flot1*, выращенные на 50% питательном растворе Хогланда. NaCl в конечных концентрациях 50 мМ или 100 мМ добавляли к ПР за 20 дней до проведения анализов (на 25 день роста). Контроль – NaCl не добавляли к ПР. Масштабная линейка 10 см.

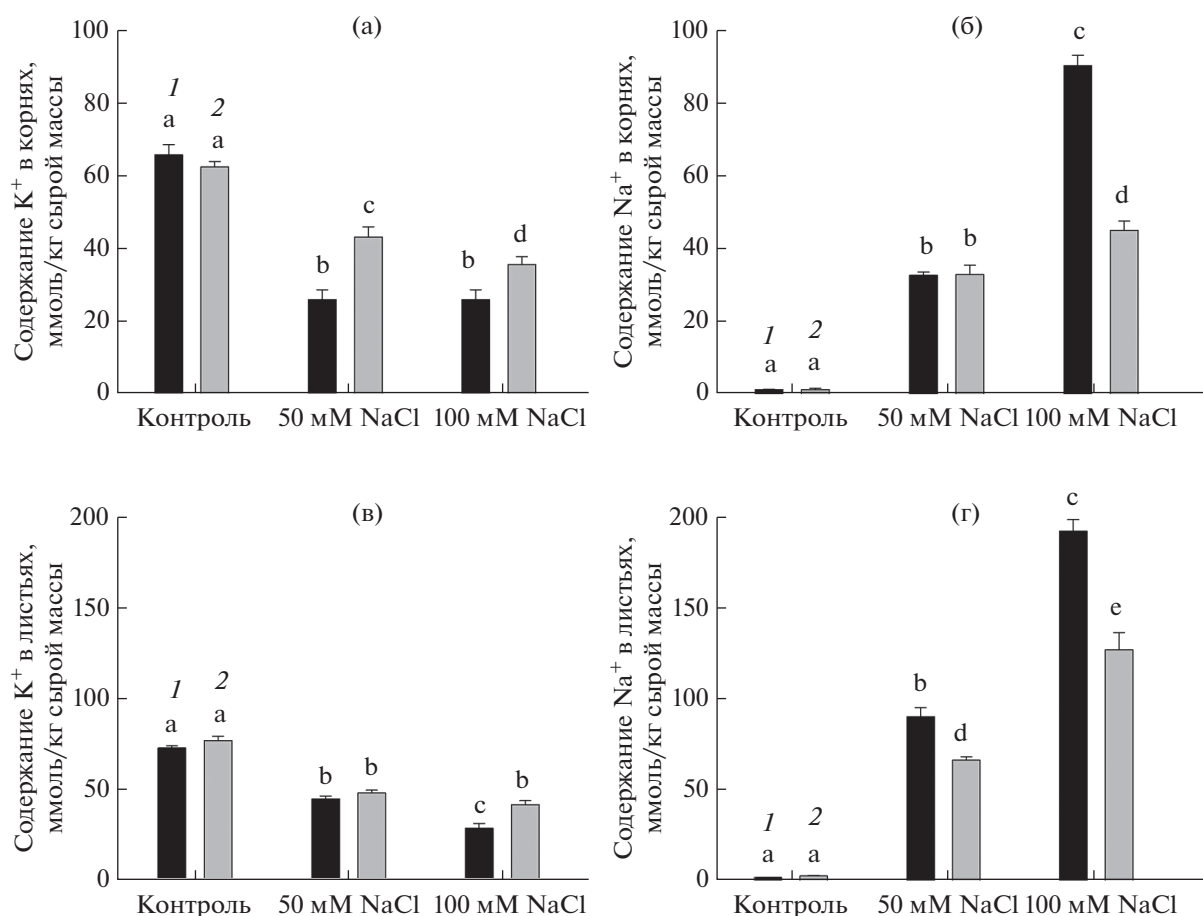


**Рис. 3.** Сырая масса корней (а) и листьев (б) растений *A. thaliana* 45-дневного возраста ДТ (1) и мутанта *flot1* (2). Растения выращивали на 50% питательном растворе Хогланда. NaCl в конечных концентрациях 50 мМ или 100 мМ добавляли к ПР за 20 дней до проведения анализа. Контроль – NaCl не добавляли к ПР. Даны средние значения и их стандартные ошибки ( $n = 3$ ). Разные буквы над столбиками указывают на статистически достоверные различия между средними значениями (ANOVA;  $P < 0.05$ ), одни и те же буквы указывают на отсутствие достоверных различий.

(рис. 4а). В листьях мутанта более высокое содержание  $K^+$  по сравнению с ДТ наблюдалось при 100 мМ NaCl в ПР (рис. 4б). Содержание  $Na^+$  в органах растений возрастало по мере увеличения концентрации NaCl в ПР, однако возрастание содержания  $Na^+$  у мутанта было выражено в меньшей степени, чем у ДТ (рис. 4б, 4г). В целом можно заключить, что мутация *Atflot1* привела к снижению содержания  $Na^+$  и к увеличению содержания  $K^+$  в корнях и листьях *A. thaliana*.

Клетки корня проростков *A. thaliana* ДТ, выращенных на ПР без NaCl, обнаружили типичную для растительных клеток ультраструктуру (рис. 5а). Выращивание проростков ДТ на среде, содержащей 100 мМ NaCl, привело к ряду изменений в

ультраструктуре клеток корня. Эти изменения в основном затронули эндоплазматический ретикулум (ЭР), вакуолярную систему, комплекс Гольджи (КГ) и пост-Гольджи структуры. В условиях засоления активировались процессы вакуолизации цитоплазмы (рис. 5б–5е). Наблюдалось набухание цистерн ЭР, которые, по-видимому, формировали микровакуоли (МВ) (рис. 5б, 5д). Как показали морфометрические измерения, под действием NaCl в цитоплазме возросло количество МВ в клетках (табл. 2), одновременно возросла доля МВ больших размерных классов и уменьшилась доля МВ малых размерных классов (рис. 6а), т.е. увеличился их размер. Эти результаты указывают на слияние МВ в более крупные структуры. Сливающиеся МВ были чаще видны



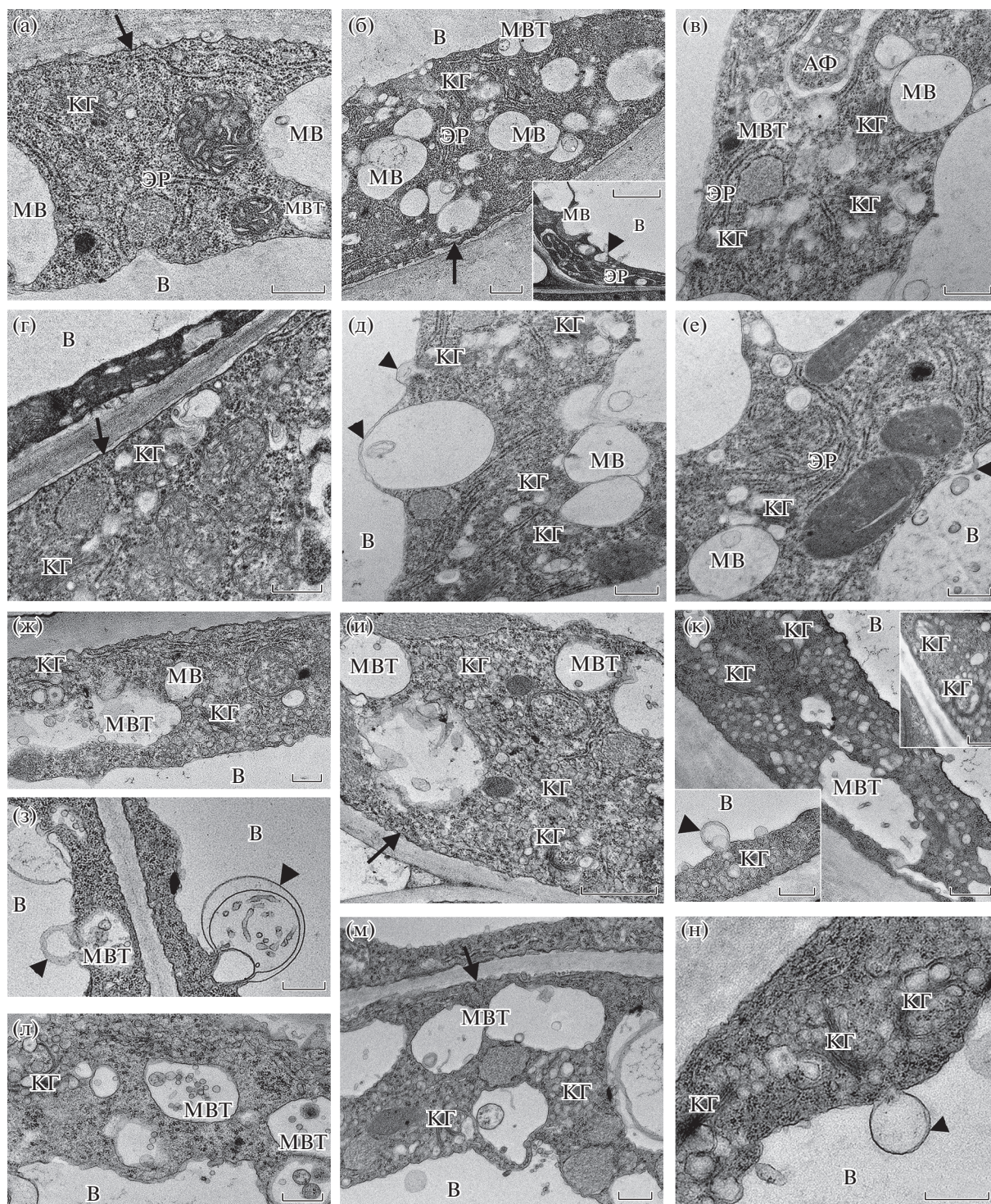
**Рис. 4.** Содержание K<sup>+</sup> (а, в) и Na<sup>+</sup> (б, г) в корнях и листьях растений *A. thaliana* 45-дневного возраста ДТ (1) и мутанта *flot1* (2). Растения выращивали на 50% питательном растворе Хогланда. NaCl в конечных концентрациях 50 мМ или 100 мМ добавляли к ПР за 20 дней до проведения анализов. Контроль – NaCl не добавляли к ПР. (а), (б) – Корни, (в), (г) – листья. Даны средние значения и их стандартные ошибки ( $n = 3$ ). Разные буквы над столбиками указывают на статистически достоверные различия между средними значениями (ANOVA;  $P < 0.05$ ), одни и те же буквы указывают на отсутствие достоверных различий.

на микрофотографиях в варианте с NaCl (рис. 5б, 5д), чем в контроле. Суммарная площадь, занятая микровакуолями на срезах, при этом увеличилась почти в 4 раза (табл. 2).

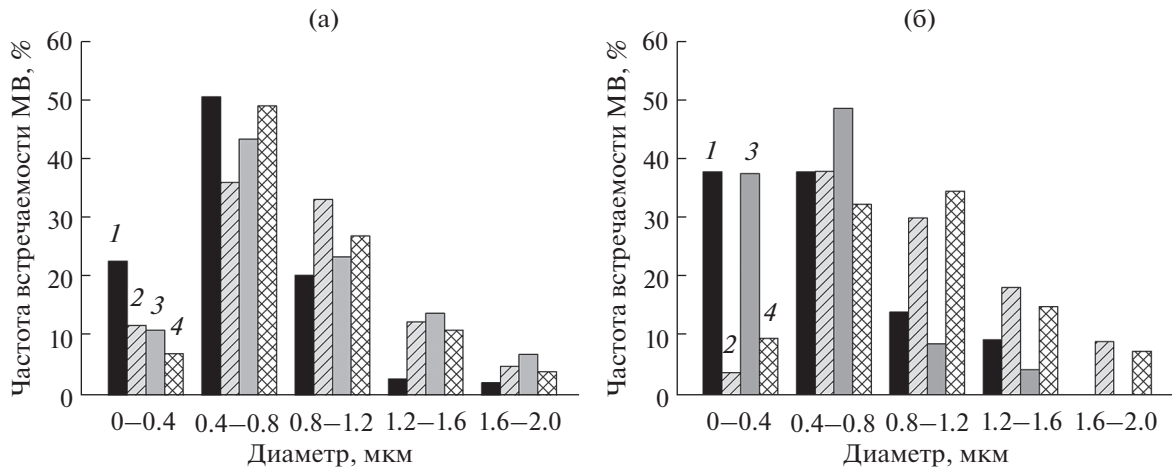
В условиях засоления, по сравнению с контролем, чаще наблюдалось отпочковывание везикул транс-Гольджи сети/ранних эндосом (ТГС/РЭ) от секреторного полюса КГ (рис. 5в–5е). Мелкие везикулы часто наблюдались внутри более крупных везикул, что, по-видимому, указывает на формирование поздних эндосом/мультивезикулярных тел (ПЭ/МВТ) (рис. 5б, 5в). Количество структур, предположительно являющихся МВТ, в цитоплазме под действием NaCl увеличилось (табл. 2), что, возможно, было результатом активирования процесса отпочковывания пост-Гольджи везикул от КГ и созревания их в МВТ. Измерение относительной частоты встречаемости МВТ разных размерных классов показало, что условия засоления мало изменили их размеры

(рис. 6б). Часто наблюдалось слияние МВТ с ПМ или тонопластом и выход везикул, содержащихся внутри МВТ, в вакуоль или периплазматическое пространство (рис. 5б, 5д). Число везикул, содержащихся внутри МВТ, в условиях засоления было меньше, чем в контроле (табл. 2).

Сравнение ультраструктуры клеток мутанта и растений ДТ, морфометрия их структур показали, что мутация *Aflot1*, как и условия засоления, повлияла на процессы везикуляции и образования эндосом. В цитоплазме накапливались везикулы диаметром приблизительно 1–2 мкм (рис. 5ж–5к, 5м, 5н), в некоторых клетках они занимали значительную часть объема цитоплазмы (рис. 5к). Содержание МВТ в расчете на единицу поверхности среза, их средний размер и среднее число везикул в люмене МВТ у мутанта были существенно больше, чем у растений ДТ (рис. 6б, табл. 2). Интенсификация образования везикул и МВТ-подобных структур, а также слияния последних с то-



**Рис. 5.** Ультраструктура клеток корней 4-дневных проростков *A. thaliana* ДТ (а–е) и мутанта *flot1* (ж–н), исследованная с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Проростки выращивали на агаризованном 50% питательном растворе Мурашиге-Скуга, содержащем 1% сахарозу, с добавлением 100 мМ NaCl или без добавления NaCl (контроль). (а) – ДТ, контроль; (б–е) – ДТ, 100 мМ NaCl; (ж–и) – *Atflot1*, контроль; (к–н) – *Atflot1*, 100 мМ NaCl. Обозначения: MB – микровакуоли, MBT – мультивезикулярные тела, B – вакуоль, АФ – аутофагосома, ЭР – эндоплазматический ретикулум, КГ – комплекс Гольджи, черные стрелки указывают на плазмалемму, черные треугольники указывают на структуры, сливающиеся с тонопластом. Масштабная линейка 0.5 мкм.



**Рис. 6.** Относительная частота встречаемости МВ (а) и МВТ (б) в клетках корней 4-дневных проростков *A. thaliana* ДТ и мутанта *flot1*, рассчитанная по данным электронных микрофотографий. Проростки выращивали на агаризованном 50% питательном растворе Мурасиге-Скуга, содержащем 1% сахарозу, с добавлением 100 мМ NaCl или без добавления NaCl (контроль). 1 – ДТ, контроль; 2 – *flot1*, контроль; 3 – ДТ, 100 мМ NaCl; 4 – *flot1*, 100 мМ NaCl.

нопластом и ПМ, была результатом как мутации, так и действия NaCl. Мутация оказала более сильное действие, чем засоление, а эффекты этих двух факторов суммировались (рис. 5ж–5н, 6б, табл. 2). У мутанта обнаружилось также снижение числа диктиосом в комплексах Гольджи и их деформация с образованием кольцеподобных структур на транс-стороне КГ, что было особенно заметно в условиях засоления (рис. 5к). Такие изменения КГ также могут отражать активирование везикулярного транспорта и ускоренное расходование материала комплексов Гольджи на образование эндосом. Следует отметить, что совместное действие двух факторов, а именно засоления и мутации *Atflot1*, заметно увеличило число комплексов Гольджи в цитоплазме (табл. 3), что указывает на активировании их биогенеза.

Мутация, в отличие от NaCl, оказала лишь слабое влияние на образование МВ в цитоплазме. В клетках проростков, выращенных в отсутствие NaCl в ПР, некоторое снижение содержания МВ в цитоплазме под действием мутации сопровож-

далось увеличением их размеров (табл. 2, рис 6а). В условиях засоления мутация практически не оказала влияния на количество и размеры микровакуолей (рис. 5к–5н, табл. 2). Клетки мутанта, выращенного на ПР с NaCl, характеризовались повышенным содержанием аутофагосом (АФ) в цитоплазме и аутофагических тел (АТ) в вакуолях, что может указывать на активированный перенос цитоплазматического материала в вакуоль посредством аутофагии (табл. 3). При этом возросшее содержание аутофагических структур в клетках было результатом синергического действия засоления и мутации.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из наиболее выраженных эффектов засоления в наших экспериментах была повышенная вакуолизация цитоплазмы и слияние образующихся МВ в более крупные структуры. Важная роль вакуолярной системы в солеустойчивости растений в настоящее время не вызывает сомне-

**Таблица 2.** Количество микровакуолей (МВ) и мультивезикулярных тел (МВТ), процент площади, занимаемой МВ и МВТ, и количество внутренних везикул МВТ на срезах клеток корней проростков ДТ и мутанта *flot1* *A. thaliana*, выращенных на средах с добавлением или без добавления 100 мМ NaCl

Варианты	Количество МВ/100 мкм <sup>2</sup>	% площади, занимаемой МВ на срезах	Количество МВТ/100 мкм <sup>2</sup>	% площади, занимаемой МВТ на срезах	Количество везикул/МВТ
ДТ, контроль	9.6 ± 0.5 <sup>b</sup>	4.3	1.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.5	5.6 ± 0.2 <sup>b</sup>
ДТ, NaCl	16.8 ± 0.4 <sup>d</sup>	16.0	2.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.1	2.8 ± 0.2 <sup>a</sup>
<i>Atflot1</i> , контроль	6.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	6.2	2.7 ± 0.1 <sup>c</sup>	3.1	6.7 ± 0.3 <sup>c</sup>
<i>Atflot1</i> , NaCl	14.5 ± 0.4 <sup>c</sup>	11.1	4.4 ± 0.2 <sup>d</sup>	5.2	8.8 ± 0.4 <sup>d</sup>

Примечание. Разными латинскими буквами обозначены достоверные различия при  $P \leq 0.05$ .



**Таблица 3.** Количество комплексов Гольджи (КГ), аутофагосом (АФ) и аутофагических тел (АТ) на срезах клеток корневых проростков ДТ и мутанта *flot1 A. thaliana*, выращенных на средах с добавлением или без добавления 100 мМ NaCl

Варианты	Количество КГ/100 мкм <sup>2</sup>	Количество АФ/100 мкм <sup>2</sup>	Количество АТ/100 мкм <sup>2</sup>
ДТ, контроль	4.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.35 ± 0.3 <sup>a</sup>
ДТ, NaCl	5.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.9 ± 0.1 <sup>b</sup>	2.6 ± 0.4 <sup>b</sup>
<i>Atflot1</i> , контроль	5.2 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.1 <sup>c</sup>	3.00 ± 0.2 <sup>c</sup>
<i>Atflot1</i> , NaCl	6.7 ± 0.1 <sup>b</sup>	2.3 ± 0.2 <sup>d</sup>	4.4 ± 0.2 <sup>d</sup>

Примечание. Разными латинскими буквами обозначены достоверные различия при  $P \leq 0.05$ .

ний. Компарментализация токсичных ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  в вакуолях понижает содержание этих ионов в цитоплазме и вносит вклад в снижение водного потенциала в клетках в условиях засоления [17–20]. Транспорт  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  из цитозоля растительных клеток в вакуоли осуществляют  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  и  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ , соответственно, антипортеры тонопласта. Первые являются  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обменниками NHX типа [21], вторые относятся к семейству хлоридных каналов CLC [19]. Источником энергии для переноса  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  является  $\Delta\mu\text{H}^+$  тонопласта, который создается вакуолярными  $\text{H}^+$ -АТФазой (V-АТФазой) и  $\text{H}^+$ -транслоцирующей пирофосфатазой (V-PPазой) [17, 18, 20]. Наряду с компарментализацией  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  в вакуолях важную роль в поддержании концентраций этих ионов в цитозоле на нетоксическом уровне играет их экспорт в наружную среду [17, 18]. Экспорт  $\text{Na}^+$  осуществляет  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -антипортер плазмалеммы, энергизуемый  $\text{H}^+$ -АТФазой Р-типа [17, 18, 21]. В транспорт  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{Cl}^-$  через плазмалемму и тонопласт вовлечены также ионные каналы и другие транспортеры [19, 20].

Ряд исследований указывает на вовлечение в механизмы ионного гомеостатирования и солеустойчивости растений везикулярного транспорта. Нокаут-мутация по гену *ARA6* семейства Rab5 малых ГТФаз, участвующего в регуляции ВТ, вызвала у *A. thaliana* сверхчувствительность к NaCl, а сверхэкспрессия мутантного гена *ARA6<sup>Q93L</sup>*, фиксирующего ARA6 в ГТФ-связанной форме, повышала их солеустойчивость [22]. Сверхэкспрессия гена *AtRabG3e (AtRab7)* активировала эндоцитоз в клетках *A. thaliana*, приводила к накоплению ионов  $\text{Na}^+$  в вакуолях и увеличению их содержания в побегах. По сравнению с ДТ, трансгенные растения демонстрировали более высокую устойчивость к NaCl [23]. На клетках корней *A. thaliana* было показано, что в ответ на повышение наружной концентрации NaCl происходит быстрое увеличение объема центральной вакуоли с сопутствующим уменьшением числа мелких вакуолей и возрастанием вакуолярной концентрации соли [24]. В настоящей работе мы также наблюдали под действием NaCl возрастание вакуолизации

цитоплазмы и слияние МВ в более крупные структуры у *A. thaliana*.

Модификации белкового состава мембран, приводящие к изменению ионного статуса растений и влияющие на их солеустойчивость, могут происходить не только за счет изменений в экспрессии белков и их посттрансляционных модификаций, но и за счет изменений в активности эндоцитозного и секреторного путей ВТ. Имеются прямые указания на динамическую регуляцию содержания ион-транспортирующих белков в мембранах посредством ВТ. Например, абсцизовая кислота (АБК), контролирующая ионный транспорт и транспирацию при водном дефиците, индуцировала селективный эндоцитоз входного (inward rectifying)  $\text{K}^+$ -канала KAT1 из ПМ замыкающих клеток устьиц *A. thaliana*. Это, в свою очередь, уменьшало поток  $\text{K}^+$  в клетки, приводило к снижению тургорного давления и стимулировало закрывание устьиц [25]. Другим примером регуляции транспортного белка посредством ВТ у растений являются индуцированные высокими концентрациями бора в среде изменения в содержании транспортера BOR1 плазмалеммы, который загружает борат в ксилему корня *A. thaliana*. BOR1 в этих условиях подвергался эндоцитозу, везикулами переносился в цитоплазму и таким образом исключался из процесса загрузки бора в ксилему [26].

Результаты электронно-микроскопического исследования ультраструктуры указывают на активирование процессов ВТ у мутанта *Atflot1* (CS444812GK), характеризующегося повышенной транскрипцией *AtFlot1*. Об этом свидетельствует возрастание числа МВТ-подобных структур и их размеров, а также числа внутренних везикул у мутанта. Такое действие мутации проявилось в наибольшей степени при засолении. В соответствии с этим, структурные изменения в аппарате Гольджи, наблюдавшиеся у мутанта в этих условиях, указывают на ускоренный биогенез этой органеллы. Наблюдавшееся нами у мутанта возросшее число аутофагических структур в условиях засоления может указывать на активирование деградационных процессов и доставку в вакуоль подлежащего деградации материала. Показано,

что в стрессовых условиях аутофагия и деградиационные процессы активируются [27].

Изменения ионного статуса *A. thaliana*, вызванные мутацией *flot1* (CS444812 GK) являются косвенным свидетельством вовлечения Flot1 в ионное гомеостатирование клеток корней *A. thaliana* в условиях засоления. Снижение содержания  $\text{Na}^+$  и повышение содержания  $\text{K}^+$  в органах у мутанта могут быть результатом флотиллин-зависимых изменений в содержании  $\text{Na}^+$ - и  $\text{K}^+$ -транспортирующих белков в плазмалемме. Как показано для некоторых растительных белков, транспортируемых преимущественно клатрин-содержащими везикулами, в частности для аквапорина PIP2;1 и NADPH оксидазы RbohD, доля флотиллин-зависимого пути резко возрастает в условиях солевого стресса [28, 29]. Рецептор брассиностероида BRI1 подвергался эндоцитозу в основном через клатрин-зависимый путь при наличии только эндогенного гормона. Добавленный эпибрасинолид существенно активировал AtFlot1-зависимый эндоцитоз BRI1 [30]. Предполагается, что для указанных белков клатрин-зависимый путь функционирует как конститутивный эндоцитозный механизм, тогда как эндоцитоз, основанный на содержащих флотиллины НД, индуцируется стрессом или в ответ на какие-то другие сигналы [1]. Флотиллин-опосредованный эндоцитоз [12] может быть непосредственным участником ремоделирования белкового состава мембран и таким образом вносить вклад в изменение ионного статуса клеток растений.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований 18-04-00504/18.

Л.А. Халилова и О.В. Сергиенко внесли равный вклад в проведенное исследование.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Daněk M., Valentová O., Martinec J. Flotillins, erlins, and HIRs: From animal base camp to plant new horizons // *Crit. Rev. Plant Sci.* 2016. V. 35. P. 191.
2. Di C., Xu W.Y., Su Z., Yuan J.S. Comparative genome analysis of PHV gene family reveals deep evolutionary origins and diverse gene function // *BMC Bioinf.* 2010. V. 11: S22.
3. Jarsch I.K., Konrad S.S.A., Stratil T.F., Urbanus S.L., Szymanski W., Braun P., Braun K.H., Ott T. Plasma membranes are subcompartmentalized into a plethora of coexisting and diverse microdomains in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* // *Plant Cell.* 2014. V. 6. P. 1698.
4. Tapken W., Murphy A.S. Membrane nanodomains in plants: capturing form, function, and movement // *J. Exp. Bot.* 2015. V. 66. P. 1573.
5. Mongrand S., Morel J., Laroche J., Claverol S., Carde J.P., Hartmann M.A., Bonneau M., Simon-Plas F., Lessire R., Bessoule J.J. Lipid rafts in higher plant cells – purification and characterization of triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 36277.
6. Ikonen E. Roles of lipid rafts in membrane transport // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001. V. 13. P. 470.
7. Banning A., Tomasovic A., Tikkanen R. Functional aspects of membrane association of reggie/flotillin proteins // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2011. V. 12. P. 725.
8. Otto G.P., Nichols B.J. The roles of flotillin microdomains – endocytosis and beyond // *J. Cell Sci.* 2011. V. 124. P. 3933.
9. Bodin S., Planchon D., Morris E.R., Comunale F., Gauthier-Rouvière C. Flotillins in intercellular adhesion – from cellular physiology to human diseases // *J. Cell Sci.* 2014. V. 127. P. 5139.
10. Meister M., Tikkanen R. Endocytic trafficking of membrane-bound cargo: a flotillin point of view // *Membranes.* 2014. V. 4. P. 356.
11. Li R.L., Liu P., Wan Y.L., Chen T., Wang Q.L., Metzbach U., Baluska F., Samaj J., Fang X.H., Lucas W.J., Lin J. A membrane microdomain-associated protein, *Arabidopsis* Flot1, is involved in a clathrin-independent endocytic pathway and is required for seedling development // *Plant Cell.* 2012. V. 24. P. 2105.
12. Haney C.H., Long S.R. Plant flotillins are required for infection by nitrogen-fixing bacteria // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. P. 478.
13. Yu M., Liu H.J., Dong Z.Y., Xiao J.W., Su B.D., Fan L.S., Komis G., Samaj J., Lin J., Li R. The dynamics and endocytosis of Flot1 protein in response to flg22 in *Arabidopsis* // *J. Plant Physiol.* 2017. V. 215. P. 73.
14. Junková P., Daněk M., Brouzdová J., Kroumanová K., Zelazný E., Janda M., Hyněk R., Martinec J., Valentová O. Mapping of plasma membrane proteins interacting with *Arabidopsis thaliana* flotillin 2 // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9. Art. 991.
15. Kroumanova K., Kocourkova D., Daněk M., Lamparova L., Pospichalova R., Malinska K., Krčková Z., Burketova L., Valentová O., Martinec J., Janda M. Characterisation of *Arabidopsis* flotillins in response to stresses // *Biologia Plantarum.* 2019. V. 63. P. 144.
16. Balnokín Yu.V., Kurkova E.B., Khalilova L.A., Myasoe-dov N.A., Yusufov A.G. Pinocytosis in the root cells of a salt-accumulating halophyte *Suaeda altissima* and its possible involvement in chloride transport // *Russ. J. Plant Physiol.* 2007. V. 54. P. 797.
17. Apse M.P., Blumwald E.  $\text{Na}^+$  transport in plants // *FEBS Letters.* 2007. V. 581. P. 2247.
18. Munns R., Tester M. Mechanisms of salinity tolerance // *Ann. Rev. Plant Biol.* 2008. V. 59. P. 651.
19. Barbier-Brygoo H., De Angeli A., Filleur S., Frachisse J.-M., Gambale F., Thomine S., Wege S. Anion channels/transporters in plants: from molecular bases to regulatory networks // *Ann. Rev. Plant Biol.* 2011. V. 62. P. 25.
20. Martinoia E., Meyer S., De Angeli A., Nagy R. Vacuolar transporters in their physiological context // *Ann. Rev. Plant Biol.* 2012. V. 63. P. 183.

21. *Bassil E., Coku A., Blumwald E.* Cellular ion homeostasis: emerging roles of intracellular NHX Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in plant growth and development // *J. Exp. Bot.* 2012. V. 63. P. 5727.
22. *Ebine K., Fujimoto M., Okatani Y., Nishiyama T., Goh T., Ito E., Dainobu T., Nishitani A., Uemura T., Sato M.H., Thordal-Christensen H., Tsutsumi N., Nakano A., Ueda T.* A membrane trafficking pathway regulated by the plant-specific RAB GTPase ARA6 // *Nat. Cell Biol.* 2011. V. 13. P. 853.
23. *Mazel A., Leshem Y., Tiwari B.S., Levine A.* Induction of salt and osmotic stress tolerance by overexpression of an intracellular vesicle trafficking protein AtRab7 (AtRabG3e) // *Plant Physiol.* 2004. V. 134. P. 118.
24. *Hamaji K., Nagira M., Yoshida K., Ohnishi M., Oda Y., Uemura T., Goh T., Sato M.H., Morita M.T., Tasaka M., Hasezawa S., Nakano A., Hara-Nishimura I., Maeshima M., Fukaki H. et al.* Dynamic aspects of ion accumulation by vesicle traffic under salt stress in *Arabidopsis* // *Plant Cell Physiol.* 2009. V. 50. P. 2023.
25. *Sutter J.-U., Sieben C., Hartel A., Eisenach C., Thiel G., Blatt M.R.* Abscisic acid triggers the endocytosis of the *Arabidopsis* KAT1 K<sup>+</sup> channel and its recycling to the plasma membrane // *Curr. Biol.* 2007. V. 17. P. 1396.
26. *Kasai K., Takano J., Miwa K., Toyoda A., Fujiwara T.* High boron-induced ubiquitination regulates vacuolar sorting of the BOR1 borate transporter in *Arabidopsis thaliana* // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 6175.
27. *Minibayeva F., Dmitrieva S., Ponomareva A., Ryabov V.* Oxidative stress-induced autophagy in plants: The role of mitochondria // *Plant Physiol. Biochem.* 2012. V. 59. P. 11.
28. *Li X.J., Wang X.H., Yang Y., Li R.L., He Q.H., Fang X.H., Luu D.T., Maurel C., Lin J.X.* Single-molecule analysis of PIP2;1 dynamics and partitioning reveals multiple modes of *Arabidopsis* plasma membrane aquaporin regulation // *Plant Cell.* 2011. V. 23. P. 3780.
29. *Hao H.Q., Fan L.S., Chen T., Li R.L., Li X.J., He Q.H., Botella M.A., Lin, J.X.* Clathrin and membrane microdomains cooperatively regulate RbohD dynamics and activity in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2014. V. 26. P. 1729.
30. *Wang L., Li H., Lv X.Q., Chen T., Li R.L., Xue Y.Q., Jiang J.J., Jin B., Baluska F., Samaj J., Wang X.* Spatiotemporal dynamics of the BRI1 receptor and its regulation by membrane microdomains in living *Arabidopsis* cells // *Mol. Plant.* 2015. V. 8. P. 1334.