ЭКОБИОТЕХ
ISSN 2618-964X http://ecobiotech-journal.ru
УДК 635.656:58.083:58.02:577.175.19 UDC 635.656:58.083:58.02:577.175.19

СВЯЗЫВАНИЕ АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТЫ ЛИПИД-ТРАНСПОРТИРУЮЩИМИ БЕЛКАМИ ГОРОХА *IN VIVO*

Вафина Г.Х., Ахиярова Г.Р., Коробова А.В., Кудоярова Г.Р.*

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия
*E-mail: kudoyarova1953@yandex.ru

Аннотация

Растительные липид-транспортирующие белки (ЛТБ) принадлежат семейству небольших широко распространенных белков, характеризующихся наличием гидрофобной впадины и осуществляющих связывание и транспорт строительных и сигнальных липидов, вторичных метаболитов и фитогормонов внутри клеток, в межклеточном пространстве, а также по сосудам флоэмы и ксилемы. Целью данной работы было установить возможность связывания молекул липид – транспортирующих белков с фитогормоном абсцизовой кислоты (АБК) *in vivo*. Объектом исследования служили семена гороха. В предварительных экспериментах с использованием методов иммуногистохимии с использованием специфических антител к ЛТБ1 нами было выявлено совпадение локализации данных белков и гормона АБК в клеточных стенках флоэмы на срезах корней гороха на фоне засоления растений. Описываемое совпадение паттернов локализации указывало на возможное связывание АБК этими белками. Способность растительных ЛТБ связываться с АБК в водном растворе подтвердилась в исследованиях с использованием 2-п-толуидинилнафталин-6-сульфоната (ТНС). Однако связывание ЛТБ с лигандами *in vitro* не всегда может должным образом отражать их взаимодействие *in vivo*. В осажденных комплексах липид-транспортирующих белков со специфическими поликлональными антителами была экстрагирована и идентифицирована с помощью твердофазного иммуноферментного анализа АБК, что подтвердило способность ЛТБ связывать этот гормон не только *in vitro*, но и *in vivo*.

Ключевые слова

липид-транспортирующие белки ◆ абсцизовая кислота ◆ дальний транспорт ◆ *Pisum sativum* L.

Поступила в редакцию: 08.09.2025
Принято в печать: 27.09.2025

ABSCISIC ACID BINDING BY PEA LIPID-TRANSPORT PROTEINS *IN VIVO*

Vafina G.H., Akhiyarova G.R., Korobova A.V., Kudoyarova G.R.*

Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia
*E-mail: kudoyarova1953@yandex.ru

Abstract

Plant lipid transfer proteins (LTPs) belong to a family of small, widespread proteins characterized by the presence of a hydrophobic cavity and binding and transporting structural and signaling lipids, secondary metabolites, and phytohormones within cells, in the intercellular space, and through phloem and xylem vessels. The aim of this study was to establish the possibility of lipid transfer protein molecules binding to the phytohormone abscisic acid (ABA) *in vivo*. Pea seeds were used as the study object. Preliminary experiments using immunohistochemistry methods with specific antibodies to LTP revealed a coincidence in the localization of these proteins and the ABA hormone in the cell walls of the phloem in sections of pea roots during salinity stress. This coincidence in localization patterns indicated the possible binding of ABA by these proteins. The ability of plant LTPs to bind ABA in aqueous solution was confirmed in studies using 2-p-toluidinylnaphthalene-6-sulfonate (THS). However, *in vitro* LTP binding to ligands may not always accurately reflect their *in vivo* interaction. After ether extraction, ABA was detected in the precipitated complexes of lipid transfer proteins with specific polyclonal antibodies, demonstrating the ability of LTP proteins to bind this plant hormone *in vivo*. In the precipitated complexes of lipid-transporting proteins with specific polyclonal antibodies, ABA was extracted and identified using enzyme-linked immunosorbent assay, which confirmed the ability of LTP to bind this hormone not only *in vitro* but also *in vivo*.

Keywords

lipid-transfer proteins ◆ abscisic acid ◆ long-distance transport ◆ *Pisum sativum* L.

Received: 08.09.2025
Accepted: 27.09.2025

Цитировать | Cite as

DOI: 10.31163/2618-964X/2025-31 EDN: XOJRLA

ВВЕДЕНИЕ

Белки-транспортеры липидов (ЛТБ) растений представляют собой небольшие основные белки, свернутые вокруг туннелеподобной гидрофобной впадины, способные обратимо связывать и переносить различные лиганды, в том числе и липофильные

фитогормоны [Finkina *et al.* 2016]. Функции ЛТБ *in vivo* до сих пор остаются предметом споров, хотя накоплены данные об их роли в биогенезе мембран, участии в отложении полимеров (кутин и суберин), в развитии и прорастании семян, росте клеточной стенки, реакций растений на абиотические и биотические стрессы [Kader, 1996; Salminen *et al.* 2016], о чем свидетельствует увеличение уровня экспрессии этих белков [Safi *et al.* 2015] в ответ на засоление [Xu *et al*. 2018], дефицит влаги [Guo *et al.* 2013], низкие температуры, инфицирование фитопатогенами [Gao *et al*. 2023]. Большой вклад в осуществление многочисленных функций белков данного семейства может вносить их взаимодействие с фитогормонами [Akhiyarova *et. al*. 2021; Melnikova *et al.* 2023]. Известно, что реакции растений на изменяющиеся условия окружающей среды координируются множеством регуляторных сетей, включая и индукцию эндогенной абсцизовой кислоты, которая является ключевым фитогормоном в передаче сигналов, обеспечивая выживание растений [Sharma and Sharma, 2023]. Транспортировка различных молекул на большие расстояния, в том числе выполняющих сигнальную функцию, осуществляется через сосудистую систему, состоящую из двух проводящих тканей – ксилемы и флоэмы [Lacombe, Achard, 2016], а функцию передачи сигналов на дальние расстояния выполняют фитогормоны [Davies *et al.* 2005; Lacombe, Achard, 2016; Kudoyarova *et al.* 2011]. Многие исследования показали сходство в участии гормонов и ЛТБ в регуляции роста и развития растений, их адаптации к изменяющимся условиям среды, а также существование связи между их функционированием. Кроме того, было показано, что во флоэмном и ксилемном соке растений обнаружены не только различные гидрофобные молекулы, гормоны и различные липиды, но и липид-связывающие белки [Melnikova *et al.* 2023; Vafina *et al.* 2024]. Одним из объяснений этой ассоциации может быть участие ЛТБ в транспорте гормонов. С помощью методов иммунногистохимии [Akhiyarova et. al 2021] было задокументировано, что паттерн локализации абсцизовой кислоты в клеточных стенках флоэмы совпадает с локализацией ЛТБ на срезах корней гороха, уровень как АБК, так и ЛТБ возрастал в условиях засоления в стенках клеток флоэмы. Исходя из анализа литературы, очевидно, что исследования, касающиеся связывания липид-транспортирующих белков с их лигандами чаще всего осуществляются с помощью методических подходов *in vitro,* что не всегда должным образом отражает их взаимодействие *in vivo* и целью данной работы было выявление присутствия комплексов ЛТБ с эндогенной АБК в белковом экстракте из семян гороха *in vivo*. Извлечение и идентификацию эндогенных лигандов из их комплекса с ЛТБ проводили при изучении их аллергенных свойств [Foo et al., 2021]. Этот же подход был использован в данной работе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили семена гороха (*Pisum sativum* L, сорт Сахарный 2). К белковому экстракту из семян гороха, который был получен как описано в [Bogdanov *et al.* 2016] и содержал ЛТБ, добавляли сыворотку, содержащую поликлональные кроличьи антитела к ЛТБ чечевицы, перекрестно реагирующие с ЛТБ гороха (были любезно предоставлены коллегами из ИБХ РАН), и инкубировали в течение ночи на холоду с последующим осаждением образовавшихся белковых комплексов. Выделение АБК проводили с помощью эфирной экстракции согласно методике, описанной ранее [Veselov *et al.* 1992]. Идентификацию АБК в полученном экстракте проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (ТФИФА) [Korobova *et al.* 2023]. Работа проводилась с использованием оборудования центра коллективного пользования «Агидель».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для того чтобы выявить присутствие комплексов АБК с ЛТБ в белковом экстракте из семян гороха был осуществлен эксперимент, схема которого представлена на рис. 1А. Белковый экстракт гороха, содержащий Ps-LTP1 инкубировали с поликлональными кроличьими антителами к ЛТБ чечевицы, перекрестно реагирующие с ЛТБ гороха с последующим осаждением образовавшихся белковых комплексов. Выделившуюся АБК в результате эфирной экстракции, идентифицировали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа. На рисунке 1Б представлены количественные данные, содержания Ps-LTP1 и эндогенной АБК в выделенных иммунных комплексах. Изначально в анализ был взят экстракт семян гороха, содержащий 1 мг суммарного белка.

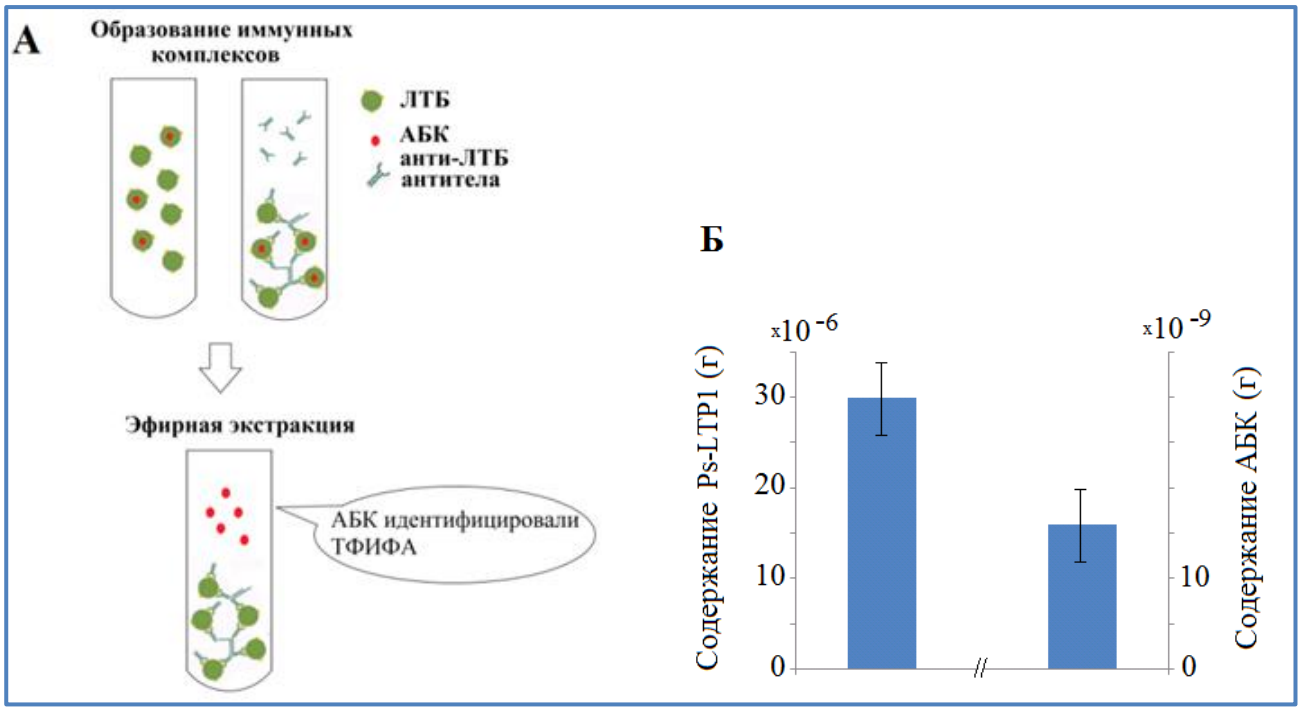

Рис. 1. Схема эксперимента образования иммунных комплексов (А). Содержание Ps-LTP1 и АБК в осажденных комплексах с поликлональными кроличьими антителами к ЛТБ чечевицы (Б)

Таким образом, в осажденных комплексах липид-транспортирующих белков со специфическими поликлональными антителами после эфирной экстракции удалось обнаружить эндогенную АБК.

Как известно, для правильной интеграции внешних факторов с эндогенной сигнализацией растений требуется действие белков-переносчиков гормонов. Диффузия этих гормонов через плазматическую мембрану играет лишь незначительную роль в естественных условиях и что для правильной доставки АБК через плазматическую мембрану из мест синтеза (сосудистые ткани) в места действия (замыкающие клетки), особенно в условиях засухи когда индуцируется биосинтез АБК, необходимы переносчики АБК [Park *et al.* 2017]. На роль одного из переносчиков гормонов на дальние расстояния идеально подходят липид-транспортирующие белки (рис. 2). Как было показано ранее, абсцизовая кислота является одним из тех гормонов, который является лигандом для ЛТБ [Akhiyarova *et al.* 2021]. Так, способность рекомбинантного Ps-LTP1 взаимодействовать с абсцизовой кислотой оценивали с помощью флуоресцентного зонда 2-п-толуидинилнафталин-6-сульфоната (ТНС). При добавлении ЛТБ к смеси ТНС и АБК флуоресценция ТНС становилась ниже, чем в

контрольной группе, когда ЛТБ воздействовал только на ТНС. АБК легко размещалась в полости Ps-LTP1, снижая флуоресценцию на 66% [Akhiyarova *et al*. 2021].

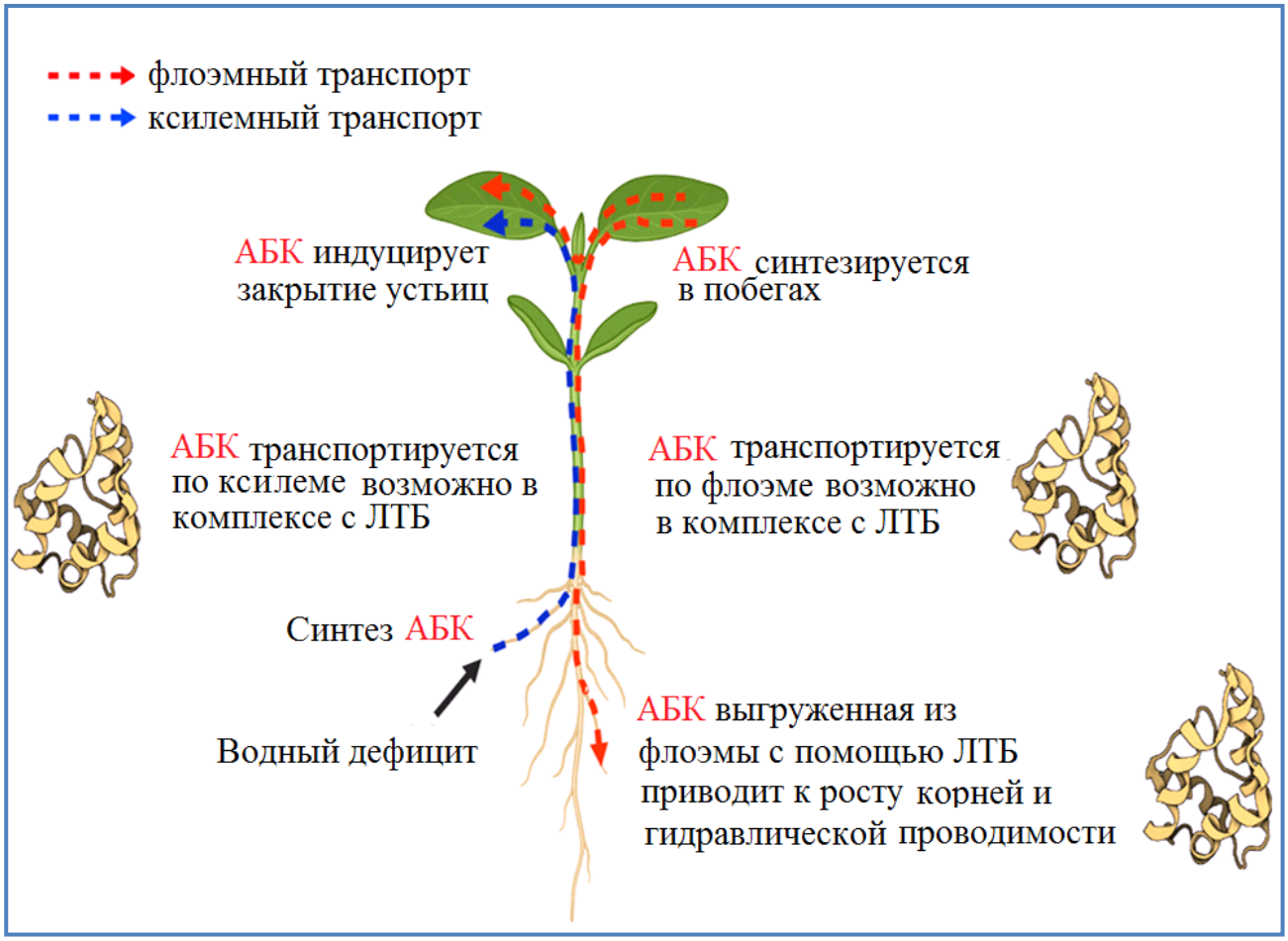

Рис. 2. Дальний транспорт АБК. АБК, синтезированная в корнях, транспортируется в листья в комплексе с ЛТБ, где она вызывает закрытие устьиц. АБК транспортируется из листьев в корни через флоэму, возможно так же в комплексе с ЛТБ. ЛТБ облегчают разгрузку АБК из флоэмы в корни, где этот фитогормон увеличивает гидравлическую проводимость корней. Показан ЛТБ из гороха *Pisum sativum*, который может связывать АБК (PDB 2N81) [Akhiyarova *et al.* 2021].]. (Рисунок является модификацией схемы, приведенной в статье [Akhiyarova et al., 2024])

Иммуногистохимические исследования также показали локализацию АБК и ЛТБ на стенках клеток флоэмы, кроме того АБК присутствовала также внутри самих клеток на срезах корней гороха и было показано, что содержание как ЛТБ, так и АБК возрастало в условиях засоления [Akhiyarova *et al*. 2021]. Это было интерпретировано как возможное участие ЛТБ в выгрузке АБК из флоэмы. Кроме того, уровень и локализация АБК в устьицах растений гороха также возрастала при засолении. Анализ ксилемного экссудата с помощью вестерн-блоттинга и иммуноферментного анализа выявил присутствие ЛТБ в ксилеме и увеличение их содержания в условиях засоления, что свидетельствовало о стресс-индуцированном накоплении АБК в регуляции уровня ЛТБ [Vafina *et al.* 2024].

Таким образом, из ЛТБ, осажденных с помощью специфических антител из белкового экстракта семян гороха, была экстрагирована и идентифицирована с помощью твердофазного иммуноферментного анализа эндогенная АБК, что подтвердило способность ЛТБ связывать этот гормон не только *in vitro*, но и *in vivo*.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке темы №123020800002-20 в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-01134-23-00.

Конфликт интересов (Conflicts of Interest)

У авторов отсутствует конфликт интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ
REFERENCES

Finkina E.I., Melnikova D.N., Bogdanov I.V., Ovchinnikova T.V. **(2016**) Lipid Transfer Proteins As Components of the Plant Innate Immune System: Structure, Functions, and Applications. *Acta Naturae*. **8**(2): 47-61. https://doi.org/10.32607/20758251-2016-8-2-47-61

Akhiyarova G.R., Ivanov R.S., Ivanov I.I., Finkina E.I., Melnikova D.N., Bogdanov I.V., Nuzhnaya T., Ovchinnikova T.V., Veselov D.S., Kudoyarova G.R. **(2021)** Effects of salinity and abscisic acid on lipid transfer protein accumulation, suberin deposition and hydraulic conductance in pea roots. *Membranes*. **11**(1): 762. https://doi.org/10.3390/membranes11100762

Akhiyarova G., Finkina E.I., Zhang K., Veselov D., Vafina G., Ovchinnikova T.V., Kudoyarova G. **(2024**) The long-distance transport of some plant hormones and possible involvement of li-pid-binding and transfer proteins in hormonal transport. *Cells*. **13**(5): 364. https://doi.org/10.3390/cells13050364

Bogdanov I.V., Shenkarev Z.O., Finkina E.I., Melnikova D.N., Rumynskiy E.I., Arseniev A.S., Ovchinnikova T.V. (**2016**) A novel lipid transfer protein from the pea *Pisum sativum*: Isolation, recombinant expression, solution structure, antifungal activity, lipid binding, and allergenic properties. *BMC Plant Biology*. **16**: 107–124. https://doi.org/10.1186/s12870-016-0792-6

Davies W.J., Kudoyarova G., Hartung W. **(2005**) Long-distance ABA signaling and its relation to other signaling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plant's response to drought. *Journal of Plant Growth Regulation.* **24**: 285-295. https://doi.org/10.1007/s00344-005-0103-1

Foo A.C.Y., Thompson P.M., Mueller G.A. (**2021**) Removal and replacement of endogenous ligands from lipid-bound proteins and allergens. *Journal of Visualized Experiments*. **24**: 10.3791/61780. https://doi.org/10.3791/61780

Gao H., Ma K., Ji G., Pan L., Zhou Q. (**2022)** Lipid transfer proteins involved in plant–pathogen interactions and their molecular mechanisms. *Molecular Plant Pathology*. **23**(12): 1815–1829. https://doi.org/10.1111/mpp.13264

Guo L., Yang H., Zhang X., Yang S. **(2013)** Lipid transfer protein 3 as a target of MYB96 mediates freezing and drought stress in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*. **64**(6): 1755-67. https://doi.org/10.1093/jxb/ert040

Kader JC. **(1996**) Lipid-transfer proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **47**: 627-654. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.627

Korobova A., Ivanov R., Timergalina L., Vysotskaya L., Nuzhnaya T., Akhiyarova G., Kusnetsov V., Veselov D., Kudoyarova G. (**2023**) Effect of low light stress on distribution of auxin (indole-3-acetic acid) between shoot and roots and devel-opment of lateral roots in barley plants. *Biology*. **12**(6): 787. https://doi.org/10.3390/biology12060787

Kudoyarova G., Veselova S., Hartung W., Farhutdinov R., Veselov D., Sharipova G. **(2011)** Involvement of root ABA and hydraulic conductance in the control of water relations in wheat plants exposed to increased evaporative demand. *Planta*. **233**: 87–94. https://doi.org/10.1007/s00425-010-1286-7

Lacombe B., Achard P. **(2016)** Long-distance transport of phytohormones through the plant vascular system. *Current Opinion in Plant Biology Journal.* **34**: 1–8. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.06.007

Melnikova D.N., Finkina E.I., Bogdanov I.V., Tagaev A.A., Ovchinnikova T.V. (**2023**) Features and possible applications of plant lipid-binding and transfer proteins. *Membranes.* **13**(1): 2. https://doi.org/10.3390/membranes13010002

Park J., Lee Y., Martinoia E., Geisler M. **(2017)** Plant hormone transporters: what we know and what we would like to know. *BMC Biology*. **15**: 93. https://doi.org/10.1186/s12915-017-0443-x

Safi H., Saibi W., Alaoui M.M., Hmyene A., Masmoudi K., Hanin M., Brini F. (**2015**) A wheat lipid transfer protein (TdLTP4) promotes tolerance to abiotic and biotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*. **89**: 64-75. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.02.008

Salminen T.A., Blomqvist K., Edqvist J. (2016) Lipid transfer proteins: classification, nomenclature, structure, and function. *Planta*. **244**: 971-997. https://doi.org/10.1007/s00425-016-2585-4

Sharma R., Sharma P. (**2023**) Role of Abscisic Acid in Plant Stress / New insights into phytohormones. https://doi.org/10.5772/intechopen.1002392

Vafina G., Akhiyarova G., Korobova A., Finkina E.I., Veselov D., Ovchinnikova T.V., Kudoyarova G. (**2024**) The long-distance transport of jasmonates in salt-treated pea plants and involvement of lipid transfer proteins in the process. *International Journal of Molecular Sciences.* **25**(13): 7486. https://doi.org/10.3390/ijms25137486

Veselov S.U., Kudoyarova G.R, Egutkin N.L., Gyuli-Zade V.G., Mustafina A.R., Kof E.K. (**1992**) Modified solvent partitioning scheme providing increased specificity and rapidity of immunoassay for indole 3-acetic acid. *Physiologia Plantarum*. **86**(1): 93–96.

Xu Y., Zheng X., Song Y. *et al*. (**2018**) NtLTP4, a lipid transfer protein that enhances salt and drought stresses tolerance in *Nicotiana tabacum*. *Scientific Reports*. **8**: 8873. https://doi.org/10.1038/s41598-018-27274-8

Цитировать как
Вафина Г.Х., Ахиярова Г.Р., Коробова А.В., Кудоярова Г.Р. (**2025**) Связывание абсцизовой кислоты липид-транспортирующими белками гороха *in vivo*. *Экобиотех.* **8** (3): 436-442. DOI: 10.31163/2618-964X/2025-31 EDN: XOJRLA

Cited as
Vafina G.H., Akhiyarova G.R., Korobova A.V., Kudoyarova G.R. (**2025**) Abscisic acid binding by pea lipid-transport proteins *in vivo*. *Ecobiotech*. **8** (3): 436-442. DOI: 10.31163/2618-964X/2025-31 EDN: XOJRLA (In Rus.)

Сведения об авторах

Гюльнара Хамидовна Вафина, к.б.н, Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия, E-mail: vafinagh@mail.ru, SPIN: 6201-2606, ORCID 0000-0003-2210-8533, Scopus: 6602208068, WoS: J-6728-2018.

Гузель Рифовна Ахиярова, к.б.н, Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия, E-mail: akhiyarova@rambler.ru, SPIN: 8518-0498, Scopus: 9333337000, ORCID: 0000-0001-8903-6648, WoS: S-3269-2017.

Алла Владимировна Коробова, к.б.н., Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия, E-mail: muksin@mail.ru, SPIN: 7004-5458, Scopus: 23097711700, ORCID: 0000-0002-5461-3553, WoS: S-5646-2017.

Гюзель Радомесовна Кудоярова, д.б.н., Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия, E-mail: kudoyarova1953@yandex.ru, SPIN: 6130-3083, Scopus: 6701540464, ORCID: 0000-0001-6409-9976, WoS: O-9782-2015.

Information About the Authors

Gulnara H. Vafina, PhD, Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia, E-mail: vafinagh@mail.ru, SPIN: 6201-2606, ORCID 0000-0003-2210-8533, Scopus: 6602208068, WoS: J-6728-2018.

Guzel R. Akhiyarova, PhD, Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia, E-mail: akhiyarova@rambler.ru, SPIN: 8518-0498, Scopus: 9333337000, ORCID: 0000-0001-8903-6648, WoS: S-3269-2017.

Alla V. Korobova, PhD, Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia, E-mail: muksin@mail.ru, SPIN: 7004-5458, Scopus: 23097711700, ORCID: 0000-0002-5461-3553, WoS: S-5646-2017.

Guzel R. Kudoyarova, Doctor of Biological Sciences, Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia,E-mail: kudoyarova1953@yandex.ru, SPIN: 6130-3083, Scopus: 6701540464, ORCID: 0000-0001-6409-9976, WoS: O-9782-2015.