

ИММУНОЛОКАЛИЗАЦИЯ ЛИПИД-ТРАНСПОРТИРУЮЩИХ БЕЛКОВ В РАСТЕНИЯХ ГОРОХА В НОРМЕ И ПРИ ЗАСОЛЕНИИ

¹Ахиярова Г.Р.*, ²Финкина Е.И., ²Овчинникова Т.В., ³Веселов С.Ю., ¹Кудоярова Г.Р.

¹Уфимский институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН,
Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 69

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической
химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук,
Россия, 1117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, дом 16/10

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального
образования Башкирский государственный университет,
Россия, 450076, Уфа, ул. Заки Валиди, 32.

*E-mail - akhیارova@rambler.ru

Резюме

Иммуногистохимическое окрашивание срезов корня растений гороха с помощью специфических антител к липид-транспортующим белкам (ЛТБ) выявило их присутствие по периметру клеток, расположенных преимущественно в зоне флоэмы. Добавление хлорида натрия в прикорневую среду растений до концентрации 50 мМ приводило к повышению уровня ЛТБ в области флоэмы. Гистохимическое окрашивание срезов на суберин с помощью судана обнаружило ускорение формирования поясков Каспари в области эндодермы под влиянием засоления, что соответствовало повышенному уровню окрашивания на ЛТБ. Эти данные подтверждают гипотезу об участии ЛТБ гороха в отложении суберина. Засоление вызывало повышение иммуноокрашивания на АБК клеток корня. Однако, распределение данного гормона отличалось от локализации ЛТБ в корнях. Следовательно, это не могло подтвердить предположение о прямом влиянии АБК на накопление ЛТБ в клетках корня гороха при засолении. Обсуждается разнообразие предполагаемых функций ЛТБ в растениях.

Ключевые слова: горох, липид-транспортующие белки, АБК, иммунолокализация, суберин, засоление

Цитирование: Ахиярова Г.Р., Финкина Е.И., Овчинникова Т.В., Веселов С.Ю., Кудоярова Г.Р.

Иммунолокализация липид-транспортующих белков в растениях гороха в норме и при засолении. *Биомика*. 2018. Т.10(4). С. 372-380. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-48

IMMUNOLOCALIZATION OF LIPID TRANSFER PROTEINS IN PEA ROOTS UNDER SALINITY

¹Akhiyarova G.R., ²Finkina E.I., ²Ovchinnikova T.V., ³Veselov S.Yu., ¹Kudoyarova G.R.

¹Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Centre, RAS, Russia, 450054, Ufa, Prospekt Oktyabrya, 69

²Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
Miklukho-Maklaya Str, 16/10, Moscow, 117997 Russia

³Bashkir State University, Russia, 450076, Ufa, Zaki-Validi Str., 32

*E-mail - akhیارova@rambler.ru

Resume

Immunohistochemical localization of lipid transfer proteins (LTPs) in the central and basal root zones of pea plants showed their presence on the periphery of cells mainly located in the phloem. Addition of NaCl (50mM) to the nutrient solution resulted in increased level of LTPs immunostaining in the phloem. The deposition of suberin in endoderma (Casparian bands) with Sudan III was more intensive under salt stress and co-located with enhanced LTP localization. These data confirm the involvement of pea LTPs in the

suberin deposition. Salt stress led to the increase in ABA immunostaining in root cells but its localization was not coincident with LTPs. Thus the assumption of the direct ABA influence on increased LTPs in pea root cells under salinity was not confirmed. The role of LTPs in plants is discussed.

Keywords: pea, lipid transfer proteins, ABA, immunolocalization, suberin, salt stress

Citation: Akhiyarova G.R., Finkina E.I., Ovchinnikova T.V., Veselov S.Yu., Kudoyarova G.R. Immunolocalization of lipid transfer proteins in pea roots under salinity. *Biomics*. 2018. V. 10(4). P. 372-380. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-48 (In Russian)

Введение

Липиды играют важную роль в жизни растений, участвуя в формировании мембран, клеточной дифференцировке, передаче внутриклеточных сигналов и сигналов между клетками, образуя непроницаемые для воды и термоизолирующие покровы, обеспечивающие защиту растений от неблагоприятных воздействий, выполняя запасающую и энергетическую функции. Белки, участвующие во внутриклеточном и внеклеточном транспорте липидов, обеспечивают их доставку к месту назначения [Финкина и др. (Finkina et al.), 2016]. Липид-транспортирующие белки (ЛТБ) – сравнительно недавно открытый класс белков, который привлек к себе пристальное внимание исследователей [Abdelkader, Mazliak, 1970; Tsuboi et al., 1992; Kader, 1996]. Характерной особенностью пространственной структуры этих белков является наличие впадины, устланной боковыми радикалами гидрофобных аминокислотных остатков [Simorre et al., 1991; Samuel et al., 2002; Cheng et al., 2004; Hoh et al., 2005]. Ее присутствие обеспечивает продемонстрированную *in vitro* способность ЛТБ образовывать комплексы с жирными кислотами и липидами и осуществлять их перенос между природными и искусственными мембранами [Tassin et al., 1998; Cheng et al., 2004; Pato et al., 2001]. Считается, что благодаря этому свойству данные белки участвуют в транспорте и метаболизме липидов [Cameron et al., 2006; Lee et al., 2009], а также в формировании гидрофобных слоев кутина и суберина [Douliez et al., 2000; Edstam, Edqvist, 2014], образующих непроницаемые для воды барьеры (например, пояски Каспари). Однако прямые доказательства этого предположения не были получены. Увеличение экспрессии генов ЛТБ происходит в условиях воздействия на растение различных неблагоприятных факторов, в связи с чем, данные белки относят к системе защиты растений от стресса [см. обзор Финкина и др., 2016 и ссылки в нем (see review Finkina et al., 2016 and references inside)].

Ранее в горохе были обнаружены три ЛТБ, названные Ps-LTP1-3. Было показано, что гены, кодирующие данные белки, дифференциально экспрессируются в различных частях растения, но в корнях присутствуют транскрипты всех трех изоформ Ps-LTP. В экспериментах по исследованию

способности Ps-LTP1 связывать гидрофобные лиганды было показано, что данный белок наиболее эффективно связывает лизофосфолипиды с ацильными радикалами C16 и ненасыщенные жирные кислоты с длиной цепи C16 и C18, содержащие различное число двойных связей, и возможно принимает участие в биосинтезе кутина и суберина [Bogdanov et al., 2016]. В данной работе мы применили иммуногистохимический подход с использованием полученных ранее [Bogdanov et al., 2015] специфичных к ЛТБ антител для выявления тканевой локализации белков данного класса, как в норме, так и в условиях солевого стресса и установления их возможных функций в корнях гороха.

Материалы и методы

Семена гороха посевного *Pisum sativum* сорта Сахарный 2 замачивали в воде в течение суток, после чего оборачивали влажной марлей для прорастания. Трехсуточные проростки гороха пересаживали на плотки, помещали в поддоны с водопроводной водой и выставляли на светоплощадку с 14-часовым фотопериодом, освещенностью 400-500 мкмоль м⁻²с⁻¹ ФАР (лампы ZN-500 и DNAT-400) и температурой 24/18°C (день/ночь). В возрасте 4 суток часть проростков переносили в поддоны с водопроводной водой, содержащей 50 мМ хлорида натрия. Замену растворов проводили ежедневно.

Фиксацию корней для изучения иммуногистохимической локализации ЛТБ и абсцизовой кислоты (АБК) производили через 1 и 7 суток после введения хлорида натрия в прикорневую среду. Для этого брали кусочки тканей корня из его центральной (середина корня) и базальной частей. Сегменты корня длиной 5 мм фиксировали в течение 12 ч в растворе 4% карбодиимида (Sigma, Германия), приготовленном на 0,1 М фосфатном буфере (pH 7.2-7.4). Карбодиимид не только фиксировал белки, но и осуществлял конъюгирование АБК с белками тканей [Ахиярова и др. (Akhiyarova et al.), 2006; Веселов (Veselov), 1998]. Затем ткани корня на 12 ч помещали в смесь 4% параформальдегида (Riedel de Haen, Германия) и 0.1% глутаральдегида (Sigma, Германия). После фиксации растительные ткани отмывали в течение 1 ч в фосфатном буфере (pH 7.2-7.4) и последовательно выдерживали по 30 минут в разведениях этанола для их дегидратации. Кусочки

корней заливали в смолу JB4 (Electron Microscopy Sciences, США). Гистологические срезы толщиной 1.5 мкм получали с помощью ротационного микротомы (HM 325, MICROM Laborgerate, Германия). Перед нанесением иммунной сыворотки срезы в течение 30 минут инкубировали при комнатной температуре в 0.1 М фосфатном буфере (по 50 мкл на каждый срез), содержащем 0.2% желатина и 0.05% Твина-20. Далее на часть срезов наносили кроличью сыворотку, содержащую поликлональные IgG антитела к ЛТБ чечевицы Lc-LTP2, перекрестно реагирующие с ЛТБ гороха (Ps-LTP1) (разведение 1:200) или — сыворотку кроликов, иммунизированных АБК (разведение 1:80). Другие срезы служили в качестве иммунологического контроля, для чего их обрабатывали неиммунной сывороткой кролика. После трехкратной промывки в растворе ФТ (0.05% Твин-20 в 0.1 М фосфатном буфере) на срезы наносили вторичные козы антивидовые антитела к IgG кролика, меченные коллоидным золотом (Au-gion, США), в разведении 1:40. Детекцию связавшихся антител проводили, нанося на срезы серебряный усилитель (Au-gion, США), и наблюдали за появлением характерного

почернения тканей в световой микроскоп. После этого серебро удаляли ополаскиванием стекол в деионизированной воде. Съемку полученных препаратов проводили с помощью цифровой камеры AxioCam Mrc5 (Carl Zeiss, Германия).

Суберин в тканях корня окрашивали спиртовым суданом III (Sigma, Германия) [Фурст (Furst), 1979]. Суберинизированные ткани окрашивались в темно-оранжевый цвет.

Результаты и обсуждение

Иммуногистохимическое исследование срезов корней контрольных растений гороха (без воздействия засоления) с помощью сыворотки, содержащей поликлональные анти-ЛТБ антитела класса IgG, показало усиление окрашивания преимущественно по периметру клеток. В связи с тем, что ЛТБ гороха, как и другие представители данного класса белков, синтезируются в виде предшественников с сигнальными N-концевыми пептидами [Bogdanov et al., 2016], это могло свидетельствовать об их локализации в апопласте (рис. 1).

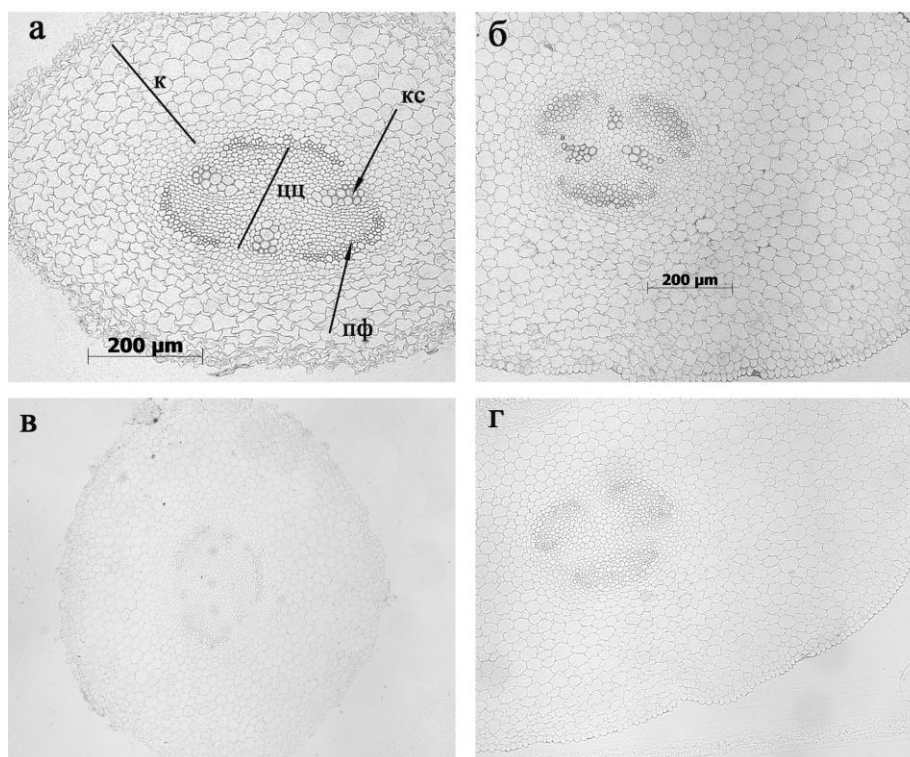


Рис. 1. Иммунолокализация ЛТБ на срезах центральной (а, в) и базальной (б, г) части корня 7-дневных контрольных растений гороха. Срезы а и б покрашены с помощью специфической сыворотки, содержащей анти-ЛТБ антитела, срезы в и г – сывороткой неиммунизированного кролика: к – кора; цц – центральный цилиндр; кс – ксилемные сосуды; пф – предполагаемая флоэма.

Fig. 1. Immunohistochemical staining of LTPs on cross sections of roots from central (a, c) and basal (b, d) zones of 7-days pea control plants. (a) and (b) sections were incubated by anti-LTP antibody, (c) and (d) - by non-immune serum. к – cortex, цц – central cylinder, кс – xylem, пф – phloem.

Наблюдаемое окрашивание проявлялось на срезах корней как в центральной (рис. 1а), так и в базальной (рис. 1б) части. Специфичность метода подтверждалась отсутствием окрашивания при обработке срезов контрольной (неиммунной) сывороткой (рис. 1в и г). По краю центрального цилиндра между радиальными рядами клеток ксилемы интенсивность окрашивания на ЛТБ была повышена в рядах, образующих дуги клеток. Количество рядов таких клеток было больше на поперечном срезе базальной части корня, по сравнению со срезом центральной части. Такое расположение и форма рядов клеток, окрашивающихся анти-ЛТБ антителами, характерны для флоэмных клеток. Недавно появившиеся литературные данные свидетельствуют о возможности транспорта липидных молекул по флоэме и участия в этом белков различных классов, связывающих гидрофобные лиганды, в том числе гомологов *Vet v 1* [Guelette et al., 2012] и ЛТБ [Carella et al., 2016]. Более того, показано, что ЛТБ могут менять свою локализацию. Например, Na-AP10

подсолнечника *Helianthus annuus* occurs в семенах находится в апопласте, но при прорастании последних проникает внутрь клеток. Таким образом, выявленное нами повышенное окрашивание в области флоэмы указывает на возможную роль ЛТБ в транспорте липидных молекул по флоэме или разгрузке флоэмы и доставке липидов из сока флоэмы к месту назначения. Так как ЛТБ гороха связывают жирные кислоты, являющиеся предшественниками суберина, а флоэма расположена близко к месту формирования поясков Каспари, выявленные нами особенности локализации ЛТБ свидетельствуют в пользу их возможного участия в отложении суберина.

Известно, что засоление ускоряет отложение суберина и формирование поясков Каспари [Perumalla, Peterson, 1986]. Гистохимическое окрашивание на суберин с помощью судана выявило формирование поясков Каспари в области эндодермы (граница между центральным цилиндром и корой – четкая линия по окружности ряда эндодермальных клеток) (рис. 2) в корнях под действием засоления (эта линия не заметна на срезе корней контрольных растений).

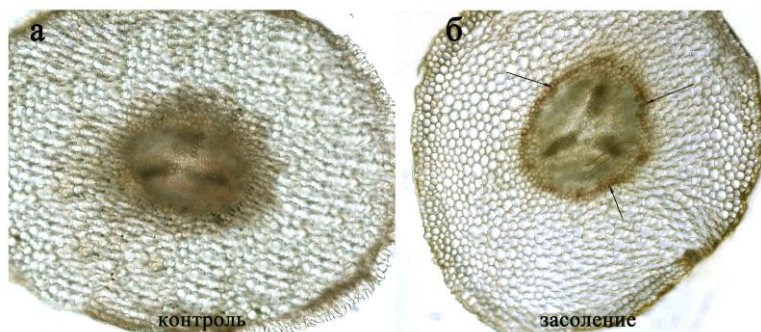


Рис. 2. Влияние засоления (50мМ NaCl) на окрашивание суданом поперечных срезов корней гороха: а — контроль; б - засоление. Стрелками отмечено окрашивание суберина в слое эндодермы.

Fig. 2. Cross sections of pea roots stained with Sudan III in control conditions (a) and under salinity (b). Suberin was stained in endodermis (arrows).

В наших экспериментах через сутки после добавления хлорида натрия в прикорневую среду не было обнаружено различий в окрашивании клеток поперечных срезов корней с помощью сыворотки с анти-ЛТБ антителами (рис. 3). Однако, воздействие недельного засоления на растения гороха приводило к заметному увеличению иммунного окрашивания клеток на поперечных срезах корня в его центральной и базальной части (рис. 4). Увеличение интенсивности окрашивания срезов анти-ЛТБ антителами при засолении в предполагаемой области локализации флоэмы, прилегающей к поясам Каспари, согласовалось с возможным участием ЛТБ в отложении суберина в области эндодермы в условиях солевого стресса.

Известно, что АБК участвует в защитном ответе растений на разные виды стресса, и, в

частности, накапливается в тканях растения при засолении [Veselov et al., 2008]. Защитное действие данного гормона обусловлено повышением уровня экспрессии генов белков, связанных с патогенезом (Pathogenesis Related Proteins или PR-белков), в том числе ЛТБ [Kim et al., 2006]. Окрашивание срезов корней гороха анти-АБК антителами выявило увеличение содержания АБК в клетках растения при засолении (рис.5). Через сутки этот эффект проявлялся в отдельных клетках коры и центрального цилиндра, а через неделю после начала действия засоления окрашивание на АБК было выше практически по всех тканях поперечного среза корней по сравнению с контролем, особенно в зоне экзодермы.

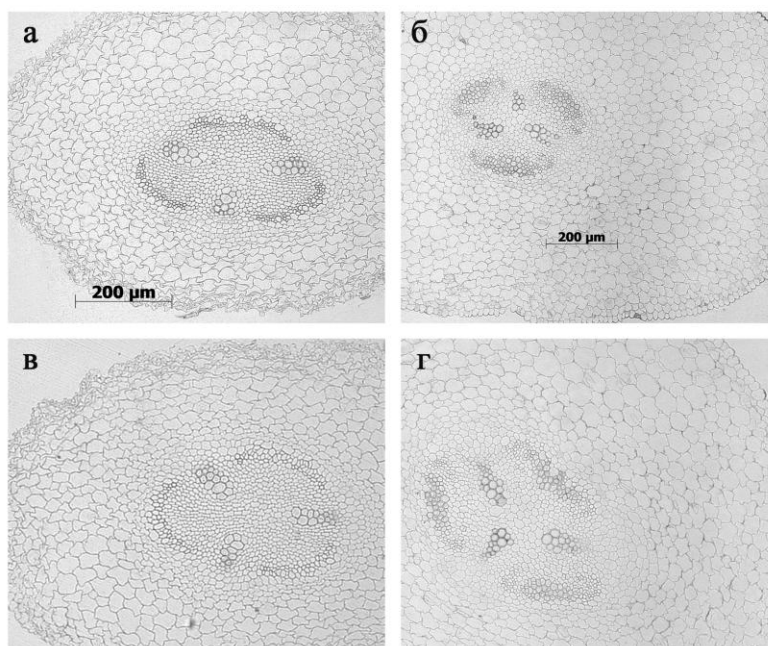


Рис. 3. Иммунолокализация ЛТБ на срезах контрольных растений гороха (а, в) и через сутки (б, г) после начала засоления. Срезы а и б — центральная часть корня, срезы в и г — базальная часть корня.

Fig. 3. Immunohistochemical staining of LTPs on cross sections of control pea roots (a, c) and in a day (b, d) after salt adding (50 mM NaCl) from central (a, b) and basal (c, d) zones.

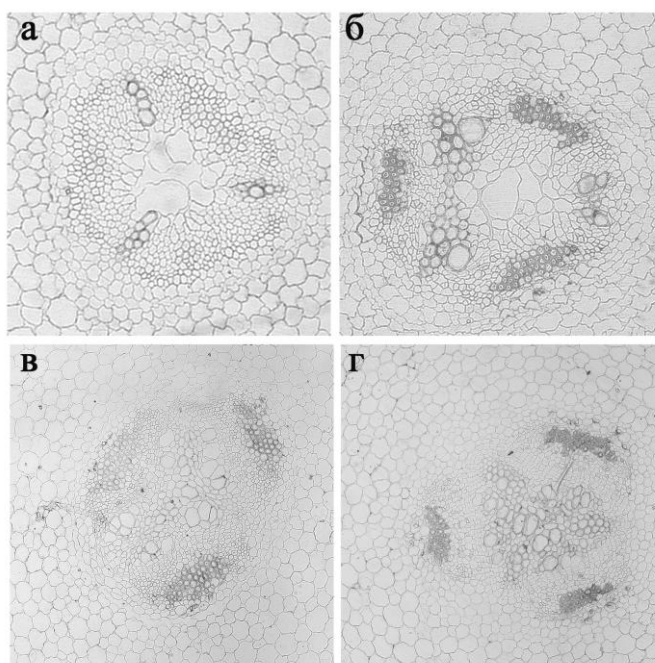


Рис. 4. Иммунолокализация ЛТБ на срезах контрольных растений (а, в) и на 7-ые сутки (б, г) после начала засоления. Срезы а и б — центральная часть корня, срезы в и г — базальная часть корня.

Fig. 4. Immunohistochemical staining of LTPs on cross sections of control pea roots (a, c) and in 7 days (b, d) after salt adding (50 mM NaCl) from central (a, b) and basal (c, d) zones.

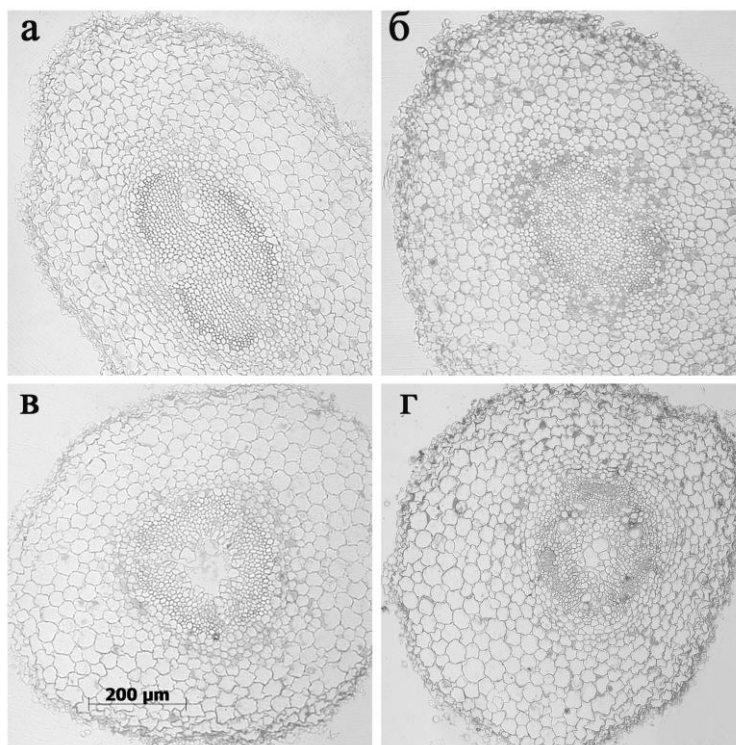


Рис. 5. Иммунолокализация АБК на срезах корней 7- (а, б) и 14-дневных (в, г) растений гороха, которые росли на среде без соли (а, в); 1 сутки (б) или 7 суток (г) на среде с добавлением 50 мМ NaCl. Все срезы покрашены с помощью специфической сыворотки, содержащей анти-АБК антитела.

Fig. 5. Immunohistochemical staining of ABA on root cross sections of 7-days (a, b) and 14-days (c, d) pea plants. Control (a, c) conditions, in 1-day (b) and in 7 days (d) after salt adding (50 mM NaCl). All sections were incubated by anti-ABA antibody.

Повышенный уровень интенсивности окрашивания срезов на АБК в области экзодермы на фоне засоления указывает на то, что этот гормон может стимулировать отложение суберина и формирование экзодермальных поясков Каспари. В тоже время такое тканевое распределение гормона, скорее всего, является следствием множественности процессов, регулируемых АБК, и не может напрямую свидетельствовать о его влиянии на накопление ЛТБ в клетках корня гороха при засолении.

Таким образом, нами выявлено, что ЛТБ гороха присутствуют в корнях растений и локализуются в клетках флоэмы. Накопление ЛТБ в ткани флоэмы происходит в условиях солевого стресса и свидетельствует об участии данных белков, связывающих предшественники суберина, в формировании непроницаемого для воды барьера в виде поясков Каспари.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 18-04-00460).

Литература

1. Ахиярова Г.Р., Фрике В., Веселов Д.С., Кудоярова Г.Р., Веселов С.Ю. Накопление и распределение АБК в тканях листа и устьичная проводимость при водном стрессе, индуцированном засолением. *Цитология*. 2006. Т. 48. №11. С. 918-923.
2. Веселов С.Ю. Использование антител для количественного определения, очистки и локализации регуляторов роста растений. Уфа: Башкирский университет, 1998. 138 с.
3. Фурст Г.Г. Методы анатомо-гистохимического исследования растительных тканей. М.: Наука, 1979. 155 с.
4. Финкина Е.И., Мельникова Д.Н., Богданов И.В., Овчинникова Т.В. Белки системы врожденного иммунитета растений, осуществляющие транспорт липидов: структура, функции и практическое применение. *Acta Naturae*. 2016. Т.8. № 2(29). С. 20-36.
5. Abdelkader, A.B., Mazliak P. Echanges de lipides entre mitochondries, microsomes et surnageant

- cytoplasmique de cellules de pomme de terre ou de chou-fleur. *Eur. J. Biochem.* 1970. V. 15. P. 250–262.
6. Bogdanov I.V., Finkina E.I., Balandin S.V., Melnikova D.N., Stukacheva E.A., Ovchinnikova T.V. Structural and functional characterization of recombinant isoforms of the lentil lipid transfer protein. *Acta Naturae.* 2015. V. 7. P. 65–73.
 7. Bogdanov I.V., Shenkarev Z.O., Finkina E.I., Melnikova D.N., Rumynskiy E.I., Arseniev A.S., Ovchinnikova T.V. A novel lipid transfer protein from the pea *Pisum sativum*: isolation, recombinant expression, solution structure, antifungal activity, lipid binding, and allergenic properties. *BMC Plant Biol.* 2016. V. 16. P. 107–124. DOI: 10.1186/s12870-016-0792-6
 8. Cameron K.D., Teece M.A., Smart L.B. Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco. *Plant Physiol.* 2006. V. 140. P. 176–183. DOI: 10.1104/pp.105.069724
 9. Carella P., Merl - Pham J., Wilson D.C., Dey S., Hauck S.M., Vlot A.C. Cameron R.K. Comparative proteomics analysis of phloem exudates collected during the induction of systemic acquired resistance. *Plant Physiol.* 2016. V.171. P.1495–510. DOI: 10.1104/pp.16.00269
 10. Cheng C.S., Samuel D., Liu Y.J., Shyu J. C., Lai S.M., Lin K.F., Lyu P.C. Binding mechanism of nonspecific lipid transfer proteins and their role in plant defense. *Biochem.* 2004. V. 43. P. 13628–13636. DOI: 10.1021/bi048873j
 11. Douliez J.P., Michon T., Marion D. Steady-state tyrosine fluorescence to study the lipid-binding properties of a wheat non-specific lipid-transfer protein (nsLTP1). *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. V. 1467. P. 65–72. DOI: 10.1016/S0005-2736(00)00197-8
 12. Edstam M.M., Edqvist J. Involvement of GPI-anchored lipid transfer proteins in the development of seed coats and pollen in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant.* 2014. V. 152(1). P. 32–42. DOI: 10.1111/pp.12156
 13. Guelette B.S., Benning U.F., Hoffman-Benning S. Identification of lipids and lipid binding proteins in phloem exudate from *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 2012. V. 63. P. 3603–3616. DOI: 10.1093/jxb/ers028
 14. Hoh F., Pons J.L., Gautier M.F., de Lamotte F., Dumas C. Structure of a liganded type 2 non-specific lipid transfer protein from wheat and the molecular basis of lipid binding. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 2005. V.61. P.397–406. DOI: 10.1107/S090744449050004174
 15. Kader J.C. Lipid-transfer proteins in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 1996. V. 47. P. 627–654. DOI: 10.1146/annurev.arplant.47.1.627
 16. Kim T.H., Kim M.C., Park J.H. Differential expression of rice lipid transfer protein gene (LTP) classes in response to abscisic acid, salt, salicylic acid, and the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. *J. Plant Biol.* 2006. V. 49. P. 371–375. DOI: 10.1007/BF03178814
 17. Lee S.B., Go Y.S., Bae H.J., Park J.H., Cho S.H., Cho H.J., Lee D.S., Park O.K., Hwang I., Suh M.C. Disruption of glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein gene altered cuticular lipid composition, increased plastoglobules, and enhanced susceptibility to infection by the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiol.* 2009. V. 150. № 1. P. 42–54. DOI: 10.1104/pp.109.137745
 18. Pato C., Borgne M., Baut G., Papec P., Marion D., Douliez J.P. Potential application of plant lipid transfer proteins for drug delivery. *Biochem. Pharmacol.* 2001. V. 62. P. 555–560. DOI: 10.1016/S0006-2952(01)00708-0
 19. Perumalla C.J., Peterson C.A. Deposition of Casparian bands and suberin lamellae in the exodermis and endodermis of young corn and onion roots. *Can. J. Bot.* 1986. V. 64. P. 1873–1878.
 20. Samuel D., Liu Y.J., Cheng C.S., Lyu P.C. Solution structure of plant nonspecific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 35267–35273. DOI: 10.1074/jbc.M203113200
 21. Simorre J., Caille A., Dominique M., Didier M., Ptak M. Two- and three-dimensional 1H NMR studies of a wheat phospholipid transfer protein: sequential resonance assignments and secondary structure. *Biochem.* 1991. V. 30. P. 11600–11608. DOI: 10.1021/bi00113a016
 22. Tassin S., Broekaert W. F., Marion D., Acland D.P., Ptak M., Vovelle F., Sodano P. Solution structure of ace-amp1, a potent antimicrobial protein extracted from onion seeds. Structural analogies with plant nonspecific lipid transfer proteins. *Biochem.* 1998. V. 37. P. 3623–3637. DOI: 10.1021/bi9723515
 23. Tsuboi S., Osafune T., Tsugeki R., Nishimura M., Yamada M. Nonspecific lipid transfer protein in castor bean cotyledon cells: subcellular localization and a possible role in lipid metabolism. *J. Biochem.* 1992. V. 3. P. 500–508.
 24. Veselov D.S., Sharipova G.V., Veselov S.Yu., Kudoyarova G.R. The effects of NaCl treatment on water relations, growth and ABA content in barley cultivars differing in drought tolerance. *J. Plant*

Growth Regul. 2008. V. 27. P. 380–386. DOI: 10.1007/s00344-008-9064-5

References

1. Abdelkader, A.B., Mazliak P. Echanges de lipides entre mitochondries, microsomes et surnageant cytoplasmique de cellules de pomme de terre ou de chou-fleur. *Eur. J. Biochem.* 1970. V. 15. P. 250–262.
2. Akhiyarova G.R., Fricke W., Veselov D.S., Kudoyarova G.R., Veselov S.Yu. ABA accumulation and distribution during the leaf tissues shows its role stomatal conductance regulation under short – term salinity. *Citologiya.* 2006. T. 48. № 11. S. 918–923.
3. Bogdanov I.V., Finkina E.I., Balandin S.V., Melnikova D.N., Stukacheva E.A., Ovchinnikova T.V. Structural and functional characterization of recombinant isoforms of the lentil lipid transfer protein. *Acta Naturae.* 2015. V. 7. P. 65-73.
4. Bogdanov I.V., Shenkarev Z.O., Finkina E.I., Melnikova D.N., Rumynskiy E.I., Arseniev A.S., Ovchinnikova T.V. A novel lipid transfer protein from the pea *Pisum sativum*: isolation, recombinant expression, solution structure, antifungal activity, lipid binding, and allergenic properties. *BMC Plant Biol.* 2016. V. 16. P. 107-124. DOI: 10.1186/s12870-016-0792-6
5. Cameron K.D., Teece M.A., Smart L.B. Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco. *Plant Physiol.* 2006. V. 140. P. 176–183. DOI: 10.1104/pp.105.069724
6. Carella P., Merl - Pham J., Wilson D.C., Dey S., Hauck S.M., Vlot A.C. Cameron R.K. Comparative proteomics analysis of phloem exudates collected during the induction of systemic acquired resistance. *Plant Physiol.* 2016. V.171. P.1495-510. DOI: 10.1104/pp.16.00269
7. Cheng C.S., Samuel D., Liu Y.J., Shyu J. C., Lai S.M., Lin K.F., Lyu P.C. Binding mechanism of nonspecific lipid transfer proteins and their role in plant defense. *Biochem.* 2004. V. 43. P. 13628–13636. DOI: 10.1021/bi048873j
8. Douliez J.P., Michon T., Marion D. Steady-state tyrosine fluorescence to study the lipid-binding properties of a wheat non-specific lipid-transfer protein (nsLTP1). *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. V. 1467. P. 65–72. DOI: 10.1016/S0005-2736(00)00197-8
9. Edstam M.M., Edqvist J. Involvement of GPI-anchored lipid transfer proteins in the development of seed coats and pollen in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant.* 2014. V. 152(1). P. 32–42. DOI: 10.1111/pp.12156
10. Finkina E.I., Melnikova D.N., Bogdanov I.V., Ovchinnikova T.V. Belki sistemi vrojdenogo immuniteta rastenii, osuschestvlyayushchie transport lipidov: struktura, funkcii i prakticheskoe primeneniye. *Acta Naturae.* 2016. T.8. № 2(29). S. 20-36.
11. Furst G.G. Metodi anatomo - gistohimicheskogo issledovaniya rastitelnih tkanei. M.: Nauka, 1979. 155 s.
12. Guelette B.S., Benning U.F., Hoffman-Benning S. Identification of lipids and lipid binding proteins in phloem exudate from *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 2012. V. 63. P. 3603-3616. DOI: 10.1093/jxb/ers028
13. Hoh F., Pons J.L., Gautier M.F., de Lamotte F., Dumas C. Structure of a liganded type 2 non-specific lipid transfer protein from wheat and the molecular basis of lipid binding. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 2005. V.61. P.397–406. DOI: 10.1107/S09074449050004174
14. Kader J.C. Lipid-transfer proteins in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 1996. V. 47. P. 627–654. DOI: 10.1146/annurev.arplant.47.1.627
15. Kim T.H., Kim M.C., Park J.H. Differential expression of rice lipid transfer protein gene (LTP) classes in response to abscisic acid, salt, salicylic acid, and the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. *J. Plant Biol.* 2006. V. 49. P. 371-375. DOI: 10.1007/BF03178814
16. Lee S.B., Go Y.S., Bae H.J., Park J.H., Cho S.H., Cho H.J., Lee D.S., Park O.K., Hwang I., Suh M.C. Disruption of glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein gene altered cuticular lipid composition, increased plastoglobules, and enhanced susceptibility to infection by the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiol.* 2009. V. 150. № 1. P. 42–54. DOI: 10.1104/pp.109.137745
17. Pato C., Borgne M., Baut G., Papec P., Marion D., Douliez J.P. Potential application of plant lipid transfer proteins for drug delivery. *Biochem. Pharmacol.* 2001. V. 62. P. 555–560. DOI: 10.1016/S0006-2952(01)00708-0
18. Perumalla C.J., Peterson C.A. Deposition of Casparian bands and suberin lamellae in the exodermis and endodermis of young corn and onion roots. *Can. J. Bot.* 1986. V. 64. P. 1873-1878.
19. Samuel D., Liu Y.J., Cheng C.S., Lyu P.C. Solution structure of plant nonspecific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 35267–35273. DOI: 10.1074/jbc.M203113200
20. Simorre J., Caille A., Dominique M., Didier M., Ptak M. Two- and three-dimensional 1H NMR

- studies of a wheat phospholipid transfer protein: sequential resonance assignments and secondary structure. *Biochem.* 1991. V. 30. P. 11600–11608. DOI: 10.1021/bi00113a016
21. Tassin S., Broekaert W. F., Marion D., Acland D.P., Ptak M., Vovelle F., Sodano P. Solution structure of ace-amp1, a potent antimicrobial protein extracted from onion seeds. Structural analogies with plant nonspecific lipid transfer proteins. *Biochem.* 1998. V. 37. P. 3623–3637. DOI: 10.1021/bi9723515
22. Tsuboi S., Osafune T., Tsugeki R., Nishimura M., Yamada M. Nonspecific lipid transfer protein in castor bean cotyledon cells: subcellular localization and a possible role in lipid metabolism. *J. Biochem.* 1992. V. 3. P. 500–508.
23. Veselov S.Yu. Ispolzovanie antitel dlya kolichestvennogo opredeleniya, ochistki i lokalizacii regulyatorov rosta rastenii. Ufa: Bashkirskii universitet, 1998. 138 s.
24. Veselov D.S., Sharipova G.V., Veselov S.Yu., Kudoyarova G.R. The effects of NaCl treatment on water relations, growth and ABA content in barley cultivars differing in drought tolerance. *J. Plant Growth Regul.* 2008. V. 27. P. 380–386. DOI: 10.1007/s00344-008-9064-5