

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Экспрессия генов транспортеров ауксина в волокнах льна (*Linum usitatissimum*) при гравитотворе

Н.Н. Ибрагимова , Н.Е. Мокшина

Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Россия  
 [nibra@yandex.ru](mailto:nibra@yandex.ru)

**Аннотация.** Гравитропизм – адаптивная реакция растений, связанная со способностью органов растений располагаться и расти в определенном направлении относительно вектора силы тяжести. При этом асимметричное распределение фитогормона ауксина считается необходимым условием для тропического изгиба органов растения. Ранее нами были описаны яркие морфологические изменения флоэмных волокон с утолщенной клеточной стенкой, находящихся на разных сторонах зрелых участков стебля в области гравитропического изгиба. Настоящее исследование – первая работа, посвященная идентификации генов, кодирующих переносчики ауксина в этих клетках на разных стадиях развития и при гравитотворе. В растениях льна идентифицированы гены основных переносчиков ауксина: AUX1/LAX, PIN-FORMED, PIN-LIKES и ABCB. Сравнительный анализ экспрессии этих генов во флоэмных волокнах льна, находящихся на разных стадиях развития, выявил повышенную экспрессию некоторых генов на стадии интрузивного роста (*LusLAX2* (A, B), *LuxPIN1-D*, *LusPILS7* (C, D)), на ранней стадии формирования третичной клеточной стенки (*LusAUX1* (A, D), *LusABCB1* (A, B), *LusABCB15-A*, *LusPIN1* (A, B), *LusPIN4-A*, *LusPIN5-A*) и на поздней стадии развития третичной клеточной стенки (*LusLAX3* (A, B)). Показано, что при гравитропизме повышалась экспрессия многих генов исследуемых семейств, в том числе отвечающих за приток ауксина в клетки (*LusAUX1-D*). Выявлена дифференциальная экспрессия генов переносчиков ауксина при гравитотворе в волокнах, находящихся на разных сторонах стебля – верхней (PUL) и нижней (OPP): различие наблюдалось за счет экспрессии генов, продукты которых отвечают за внутриклеточный транспорт (*LusPILS3*, *LusPILS7-A*) и отток ауксина из клеток (*LusABCB15-B*, *LusABCB19-B*). Повышенная экспрессия PIN-генов и ABCB-генов была более типична для волокон OPP-стороны стебля. Полученные результаты позволяют сделать предположение о наличии дифференциального содержания ауксина в волокнах разных сторон стебля гравитостимулированных растений льна, которое, возможно, определяется неравномерным оттоком ауксина. Исследование дает представление о переносчиках ауксина во льне и закладывает основу для дальнейшего изучения их функций в развитии флоэмного волокна и при гравитотворе.

Ключевые слова: лен; *Linum usitatissimum* L.; гравитропизм; волокно; транспорт ауксина; экспрессия генов.

**Для цитирования:** Ибрагимова Н.Н., Мокшина Н.Е. Экспрессия генов транспортеров ауксина в волокнах льна (*Linum usitatissimum*) при гравитотворе. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(1):33-43. DOI 10.18699/VJGB-24-05

## Expression of auxin transporter genes in flax (*Linum usitatissimum*) fibers during gravity response

N.N. Ibragimova , N.E. Mokshina

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia  
 [nibra@yandex.ru](mailto:nibra@yandex.ru)

**Abstract.** Gravitropism is an adaptive reaction of plants associated with the ability of various plant organs to be located and to grow in a certain direction relative to the gravity vector, while usually the asymmetric distribution of the phytohormone auxin is a necessary condition for the gravitropical bending of plant organs. Earlier, we described significant morphological changes in phloem fibers with a thickened cell wall located on different sides of the stem in the area of the gravitropic curvature. The present study is the first work devoted to the identification of genes encoding auxin transporters in cells at different stages of development and during gravity response. In this study, the flax genes encoding the AUX1/LAX, PIN-FORMED, PIN-LIKES, and ABCB auxin transporters were identified. A comparative analysis of the expression of these genes in flax phloem fibers at different stages of development revealed increased expression of some of these genes at the stage of intrusive growth (*LusLAX2* (A, B), *LuxPIN1-D*, *LusPILS7* (C, D)), at the early stage of tertiary cell wall formation (*LusAUX1* (A, D), *LusABCB1* (A, B), *LusABCB15-A*, *LusPIN1* (A, B), *LusPIN4-A*, and *LusPIN5-A*), and at the late stage of tertiary cell wall development (*LusLAX3* (A, B)). It was shown that in the course of gravitropism, the expression of many genes, including those responsible for the influx of auxin in cells (*LusAUX1-D*), in the studied families increased. Differential expression of auxin transporter genes was revealed during gravity response in fibers located on different sides of the stem (upper (PUL) and lower (OPP)). The difference was observed due to the

expression of genes, the products of which are responsible for auxin intracellular transport (*LusPILS3*, *LusPILS7-A*) and its efflux (*LusABCB15-B*, *LusABCB19-B*). It was noted that the increased expression of *PIN* genes and *ABCB* genes was more typical of fibers on the opposite side. The results obtained allow us to make an assumption about the presence of differential auxin content in the fibers of different sides of gravistimulated flax plants, which may be determined by an uneven outflow of auxin. This study gives an idea of auxin carriers in flax and lays the foundation for further studies of their functions in the development of phloem fiber and in gravity response.

**Key words:** flax; *Linum usitatissimum* L.; gravitropism; fiber; auxin transport; gene expression.

**For citation:** Ibragimova N.N., Mokshina N.E. Expression of auxin transporter genes in flax (*Linum usitatissimum*) fibers during gravity response. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(1): 33-43. DOI 10.18699/VJGB-24-05

## Введение

Растения находятся под постоянным действием абиотических и биотических факторов, в том числе неблагоприятных. Активность и скоординированные действия переносчиков ауксина (индолил-3-уксусная кислота, ИУК) в растениях лежат в основе гибкой сети, которая мобилизует ИУК в ответ на многие изменения окружающей среды. Это касается и тропизмов растений. Независимо от задействованных механизмов, активность фитогормона ауксина имеет решающее значение для всех тропизмов, включая гравитропизм (Harrison, Pickard, 1989; Evans, 1991; Li et al., 1991; Rakusová et al., 2019). Показано, что ингибиторы транспорта ИУК блокируют развитие гравитропической реакции в растениях (Li et al., 1991). Неравномерное распределение ауксина с участием белков-переносчиков при гравитропизме является важной областью как фундаментальных, так и прикладных исследований, связанных с полеганием растений.

Реализация гравитропического изгиба связана с формированием у растений гравитропического изгиба, которое происходит с участием разных механизмов. В молодых, активно растущих органах (корни проростков, гипокотили, coleoptили) изгиб формируется за счет разной скорости растяжения клеток на противоположных сторонах гравитимулированного органа (Harrison, Pickard, 1989; Li et al., 1991; Zhu et al., 2019). Гравитропический изгиб зрелых побегов, помимо вышеупомянутого механизма (который, по всей видимости, продолжает иметь место в растущей верхушке растения), в частях стебля, прекративших удлинение, происходит за счет предполагаемых «сократительных» свойств волокон (Ibragimova et al., 2017). Механизм формирования гравитропического изгиба зрелых побегов имеет также свои особенности у представителей разных систематических групп растений: у покрытосеменных древесных растений изгиб возникает за счет изменения камбиальной активности и формирования третичной клеточной стенки (ТКС) в ксилемных волокнах на верхней стороне гравитимулированного органа, приводящих к образованию древесины натяжения (Haugreen, Wouyer, 1996; Jourez et al., 2001). В зрелых побегах голосеменных гравитропический изгиб обеспечивает новообразование древесины сжатия, которая появляется на нижней стороне гравитимулированного органа (Timell, 1969). Наконец, в зрелых однолетних побегах травянистых растений, включая лен, гравитропический изгиб обеспечивают, как мы предполагаем, и первичные флоэмные волокна, имеющие ТКС, хотя в ксилемных волокнах верхней стороны стебля тоже наблюдается появление ТКС (Ibragimova et al., 2017). И если в случае молодых органов роль ауксина в форми-

ровании изгиба активно изучается, то для относительно зрелых органов информация о распределении ИУК очень ограничена и противоречива (Hellgren et al., 2004; Gerttula et al., 2015).

Ауксин распределяется в организме растения с помощью двух различных, но взаимосвязанных транспортных систем: во-первых, быстрого потока во флоэме вместе с фотосинтетическими ассимилятами и, во-вторых, медленного и направленного полярного переноса ауксина от клетки к клетке (Adamowski, Friml, 2015). Во время как флоэмная транспортировка обеспечивает общий способ доставки ауксина из мест его синтеза к органам-реципиентам, полярный транспорт распределяет ауксин точным образом, что критически важно для формирования локальных максимумов ауксина и является одним из ключевых элементов в его функционировании (Friml et al., 2002; Zažímalová et al., 2010; Adamowski, Friml, 2015). Переносчики ауксина семейства *PIN* образуют основную часть этой системы, контролируя направление и скорость транспорта через ряд клеток (Zažímalová et al., 2010). Что касается возможных изменений в экспрессии генов белков *PIN*, то соответствующие данные в настоящее время ограничены несколькими модельными видами.

Кроме семейства *PIN* (*PIN-FORMED*), транспорт ауксина осуществляется другими типами белков: *AUX1/LAX* (*AUXIN-INSENSITIVE1/LIKE AUX1*), *ABCB* (подсемейство ATP-binding cassette транспортеров), *PILS* (*PIN-LIKES*), *NRT1.1* (nitrate transporter 1.1) и *WAT1* (*WALLS ARE THIN1*) (Manna et al., 2022). Считается, что при низком pH апопласта ауксин становится протонированным и может проникать в клетку путем диффузии. В определенных типах клеток ауксин может транспортироваться в цитозоль белками-переносчиками – представителями семейства *AUX1/LAX* (Swarup, Péret, 2012). Внутри клетки ауксин становится отрицательно заряженным, и, следовательно, требуются переносчики, такие как *PIN* и *ABCB*, обеспечивающие его отток через клеточную мембрану в апопласт (Zažímalová et al., 2010). Менее охарактеризованная группа транспортных белков *PILS*, вероятно, ответственна за внутриклеточный транспорт ауксина (Barbez et al., 2012).

В данном исследовании в растениях льна были идентифицированы гены основных белков-переносчиков ауксина (*PIN*, *AUX1/LAX*, *ABCB* и *PILS*) и проведена оценка их экспрессии с помощью сравнительного транскриптомного анализа флоэмных волокон контрольных и гравитимулированных растений льна. В качестве модельной системы нами были выбраны флоэмные волокна льна на разных стадиях развития (с первичной и утолщенной ТКС), а так-

же флоэмные волокна с разных сторон гравистимулированных растений льна на поздней стадии развития ТКС. Флоэмные волокна льна расположены вдоль всего стебля в виде пучков (что упрощает их выделение на разных стадиях развития, разобщенных в пространстве и во времени): волокна достигают конечной длины в ходе интрузивного роста, а затем в клетках последовательно откладываются слоями вторичной и третичной КС (Gorshkova et al., 2003). Все это позволяет проводить разноплановые исследования на уровне клеток. Показано, что при гравистимуляции льна флоэмные волокна, локализованные на разных сторонах стебля (верхней (PUL) и нижней (OPP)), имели морфологические и структурно-биохимические изменения (Ibragimova et al., 2017, 2020). Анализ экспрессии генов, кодирующих основные переносчики ауксина, в изолированных волокнах позволит выявить тип транспорта ауксина, который, как мы предполагаем, активизируется во флоэмных волокнах при гравитовете.

## Материалы и методы

**Идентификация переносчиков ауксина.** В работе при использовании базы данных Phytozome были выявлены последовательности белков, содержащие функциональные домены (Pfam) PF01490, PF03547 и PF03547, PF00005, характерные для AUX1/LAX, PIN/PILS и ABCB ауксиновых транспортеров соответственно. Идентифицированные гены переносчиков ауксина у льна были названы в соответствии с ортологичной последовательностью *Arabidopsis thaliana* (резуховидки); функции продуктов всех выявленных генов являются предположительными, поскольку их аннотация построена исключительно на гомологии к охарактеризованным генам резуховидки. Все последовательности анализируемых генов представлены в Приложении<sup>1</sup>.

**Уровень экспрессии генов и филогенетический анализ.** 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/>) (Mokshina et al., 2021). Для анализа брали флоэмные волокна на разной стадии развития: до формирования ТКС (фаза интрузивного роста – iFIBa), на начальной стадии формирования ТКС (tFIBa), на поздней стадии формирования ТКС (tFIBb), а также на разных сторонах стебля (PUL – верхняя при подъеме растения, OPP – нижняя) поздней стадии формирования ТКС при гравистимуляции. Гравистимуляцию проводили путем наклона растений (у основания) параллельно почве (90 градусов). Экспрессию генов в волокнах на поздней стадии формирования ТКС анализировали через 8, 24 и 96 часов после наклона растений. Обсуждаются более чем двукратные изменения.

Для построения филогенетического дерева использовали метод Maximum Likelihood, модель Le\_Gascuel\_2008 (LG+G); бутстреп-поддержка 1000. Выполнено в программе MEGA7.

## Результаты

Были идентифицированы гены основных семейств транспортеров ауксина: AUX1/LAX, ответственных за приток

ауксина в клетку (Swarup, Péret, 2012), PIN-FORMED и ABCB, ответственных в основном за отток ауксина (Zažímalová et al., 2010), PIN-LIKES (PILS), ответственных за внутриклеточный транспорт ауксина (Barbez et al., 2012), и проанализирована их экспрессия.

## Идентификация и экспрессия *LusPIN* и *LusPILS*

В геноме льна при поиске в базе данных Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) по наличию домена мембранных транспортеров PF03547 выявлено 34 гена, которые соответствуют 12 ортологам в геноме резуховидки; всего в резуховидке обнаружено 15 генов с PF03547 (8 – PIN, 7 – PILS).

Последовательность гена *Lus10020829* (*AT2G01420*, *PIN4*) была нами скорректирована в программе Augustus (<https://bioinf.uni-greifswald.de/augustus/>) и продолжена за счет последовательности *Lus10020830*. При корректировке учитывали также результаты BLASTX Arabi/Clami/Rice, доступные в базе Phytozome (JBrowse) (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/jbrowse/index.html>). Аналогичным образом были отредактированы еще шесть последовательностей: *Lus10009685* (*AT1G73590*, *PIN1*), *Lus10002280* (*AT1G71090*, *PILS2*), *Lus10018006* (*AT1G73590*, *PIN1*), *Lus10036000* (*AT1G71090*, *PILS2*; *Lus100360001* исключена из анализа), *Lus10042003* (*AT1G73590*, *PIN1*), *Lus10016704* (*AT1G71090*, *PILS2*). Последовательность *Lus10004059* (*AT1G71090*, *PILS2*) включала в себя фрагмент из 119 неидентифицированных аминокислот (из 443), что связано, по всей видимости, с проблемами исходного секвенирования и/или сборки генома. Из последовательности *Lus10016688* были удалены лишние домены, после чего был установлен ближайший к ней гомолог – *PILS7* (*AT5G65980*). Из последовательности *Lus10019229* (*AT1G20925*, *PILS1*) были удалены чужеродные домены, но ее нельзя считать предсказанной полностью, так как в ней не удалось *in silico* установить положение стартокодона. Последовательность *Lus10012680* (*AT2G01420*, *PIN4*) была увеличена с 231 до 517 аминокислот. Из анализа исключались последовательности, где не предсказывались трансмембранные домены. При корректировке последовательностей была восстановлена целостность некоторых доменов, число трансмембранных доменов и молекулярная масса приблизились к показателям, характерным для представителей анализируемого семейства.

Таким образом, после биоинформатического анализа и корректировки из 34 осталось 27 последовательностей, аннотированных как мембранные транспортеры PIN или PILS, которые мы использовали для дальнейшего анализа (табл. 1).

Молекулярная масса данных белков варьировала от 33.5 до 75 кДа, значение pI – от 5.3 до 9.6, количество трансмембранных доменов – от 5 до 10 (см. табл. 1).

Для аннотации генов *PIN/PILS* в дополнение к результатам BLAST мы провели филогенетический анализ аминокислотных последовательностей PIN/PILS резуховидки и льна (рис. 1). Анализируемые последовательности ожидаемо разделились на две кланды – PIN и PILS. Многим ортологам PIN резуховидки соответствовало два гена-паралога в геноме льна (*PIN2*, 5, 8), четыре последовательности льна находились в одной группе с *PIN1* резу-

<sup>1</sup> Приложение см. по адресу:

<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2024-28/appx1.xlsx>

**Таблица 1.** Перечень и некоторые характеристики последовательностей LusPIN и LusPILS

LUS	AT	Название для LUS	AA	Mw, кДа	pI	TMH_LUS	TMH_AT
Lus10009054	AT1G73590	PIN1-A	613	66.0	8.9	9	9
<b>Lus10009685/86</b>	AT1G73590	PIN1-B	510	55.1	9.3	9	9
<b>Lus10018006/07</b>	AT1G73590	PIN1-C	498	53.7	9.0	9	9
<b>Lus10042003/04</b>	AT1G73590	PIN1-D	568	61.5	8.8	7	9
Lus10001429	AT5G57090	PIN2-A	650	69.5	9.1	9	9
Lus10001637	AT5G57090	PIN2-B	648	69.2	9.2	9	9
Lus10012680	AT2G01420	PIN4-A	517	57.0	8.8	7	10
<b>Lus10020829/30</b>	AT2G01420	PIN4-B	528	56.8	9.6	8	10
Lus10020193	AT5G16530	PIN5-A	354	38.8	7.4	9	9
Lus10026994	AT5G16530	PIN5-B	354	38.9	8.0	9	9
Lus10010303	AT5G15100	PIN8-A	359	39.3	9.3	8	8
Lus10013422	AT5G15100	PIN8-B	359	39.1	9.4	8	8
Lus10004287	AT1G20925	PILS1-A	417	44.5	8.3	9	9
Lus10016046	AT1G20925	PILS1-B	434	46.7	8.2	8	9
Lus10019229*	AT1G20925	PILS1-C	309	33.5	8.9	5	9
Lus10030715	AT1G20925	PILS1-D	394	42.8	9.3	8	9
<b>Lus10002280/81</b>	AT1G71090	PILS2-A	388	40.8	5.9	6	8
Lus10004059*	AT1G71090	PILS2-B	442	48.7	?	7	8
<b>Lus10016704/05</b>	AT1G71090	PILS2-C	465	51.1	5.3	9	8
<b>Lus10036000/01</b>	AT1G71090	PILS2-D	508	55.8	6.6	8	8
Lus10025166	AT1G76520	PILS3	406	43.5	7.8	9	10
Lus10003240	AT5G01990	PILS6-A	692	75.3	5.9	8	10
Lus10035610	AT5G01990	PILS6-B	422	45.3	8.2	9	10
Lus10001303	AT5G65980	PILS7-A	396	42.7	6.5	8	8
Lus10012708	AT5G65980	PILS7-B	396	42.7	6.3	8	8
Lus10016688	AT5G65980	PILS7-C	408	44.5	6.1	8	8
Lus10035978	AT5G65980	PILS7-D	392	42.8	6.7	8	8

Примечание. Здесь и далее: LUS – *Linum usitatissimum*; AT – *Arabidopsis thaliana*, AA – количество аминокислот; Mw – молекулярная масса, кДа; pI – изоэлектрическая точка; TMH – количество трансмембранных доменов.

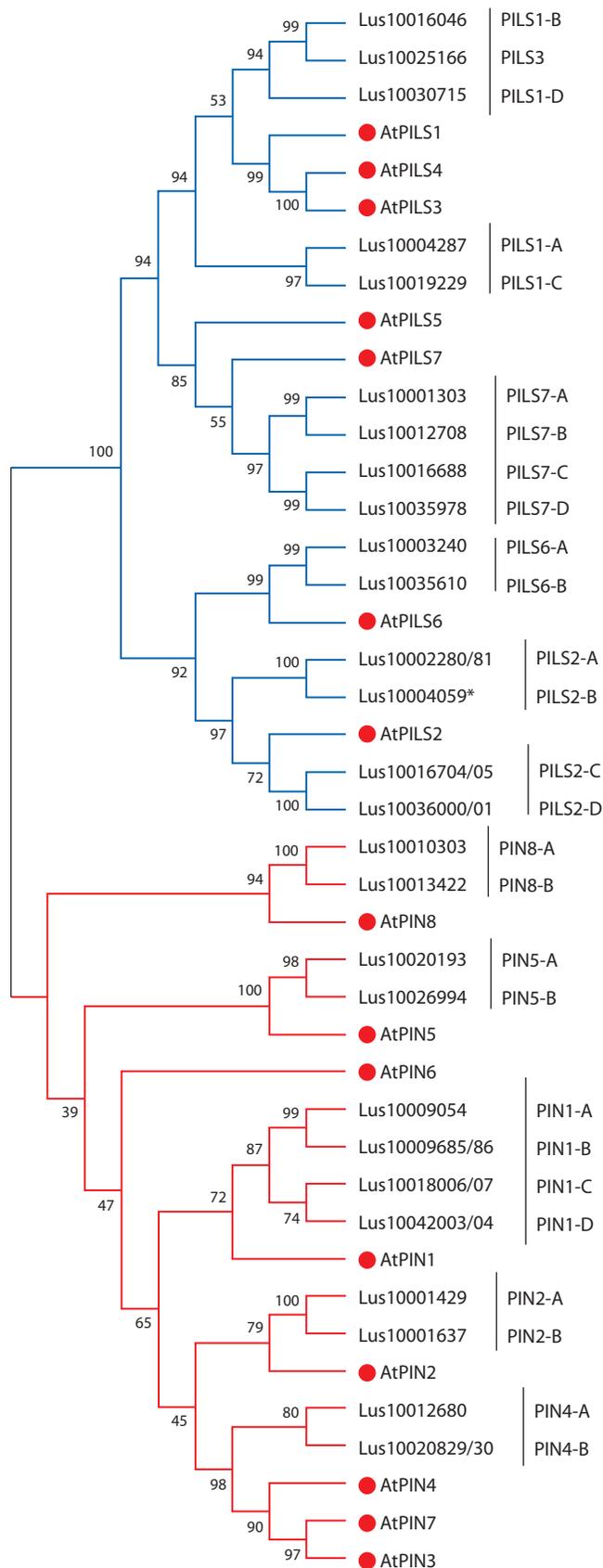
Полужирным выделены скорректированные последовательности; \* – неполные последовательности.

ховидки, а две последовательности льна соответствовали группе AtPIN3/4/7. Также дублированы были и многие PILS (см. рис. 1).

Экспрессия генов *Lus10001429* (*LusPIN2-A*), *Lus10001637* (*LusPIN2-B*), *Lus10004287* (*LusPILS1-A*), *Lus10002280* (*LusPILS2-A*), *Lus10010303* (*PIN8-A*) была низкой (<16 TGR) и далее не анализировалась. На разной стадии развития и при гравистимуляции в волокнах экспрессировались 22 *PIN/PILS*. По динамике экспрессии можно выделить несколько групп генов. Интересно, что повышенный уровень экспрессии в волокнах только на стадии удлинения показали три гена (*LusPIN1-D*, *LusPILS7-C, D*), их экспрессия уменьшалась в зрелых волокнах и не имела различий в волокнах при гравистимуляции (рис. 2).

Также была выявлена группа генов, имевшая выраженный пик экспрессии в волокнах на ранней стадии формирования ТКК (tFIBa) (рис. 3, *LusPIN1-A, B, LusPIN4-A*) или почти одинаковый уровень в волокнах при удлинении и формировании утолщенной КС (см. рис. 3, *LusPIN1-C, LusPIN4-B, LusPILS2-B*). Экспрессия всех этих генов снижалась в зрелых волокнах и снова активировалась при гравистимуляции, особенно в ОРР-образцах. Пик экспрессии при гравистимуляции приходился на 24 ч, затем экспрессия снижалась и была близка минимальным значениям, характерным для контрольных tFIBb образцов.

Экспрессия некоторых генов не менялась существенно во всех образцах (*LusPILS2-C, D*) или же была повышена в волокнах на ранней стадии формирования ТКК (tFIBa) (*LusPIN5-B, LusPILS1-C, D, LusPILS6-A, B, LusPILS7-B*),



**Рис. 1.** Филогенетическое дерево для аминокислотных последовательностей PF03547 резуховидки и льна.

Метод Maximum Likelihood, модель Le\_Gascuel\_2008 (LG+G). Бутстреп-поддержка 1000. Выполнено в программе MEGA7. Красным обозначены последовательности резуховидки.

но практически не различалась в волокнах при гравистимуляции (данные не приводятся). На рис. 4 показана экспрессия генов, максимальное значение которой наблюдали при гравистимуляции. *LusPIN5-A* имел максимальный уровень экспрессии в волокнах PUL через 96 ч после гравистимуляции. *LusPILS3* отличался повышенным уровнем экспрессии в OPP-образцах через 8 ч, пик экспрессии наблюдали и в PUL-образцах, но через 24 ч после начала гравистимуляции (см. рис. 4).

Три гена из 22 показали повышенный уровень экспрессии только при гравистимуляции, причем особенно в PUL-образцах через 24 ч (*LusPIN8-B*) или через 8 ч от начала гравистимуляции (*LusPILS1-B*, *LusPILS7-A*). Экспрессия *LusPIN8-B* снижалась в PUL-образцах через 96 ч, но при этом увеличивалась в OPP (рис. 5). Наиболее контрастная экспрессия между PUL и OPP была продемонстрирована для *LusPILS7-A*, которая почти нивелировалась через 96 ч.

### Идентификация и экспрессия *LusAUX1/LAX*

Переносчики притока ауксина *LusAUX1/LAX* обладают консервативным доменом PF01490 (Transmembrane amino acid transporter protein). У *A. thaliana* семейство *AUX1/LAX* представлено четырьмя высококонсервативными генами – *AUX1*, *LAX1*, *LAX2* и *LAX3*, которые кодируют белки, имеющие сходство с переносчиками аминокислот (Young et al., 1999). Всего в базе данных Phytozome представлено 82 гена льна с PF01490. Их них 8 кодируют транспортеры ауксина и соответствуют трем генам-ортологам резуховидки (*AUX1*, *LAX2*, *LAX3*). Все гены этой группы кодируют белки, близкие по молекулярной массе и изоэлектрической точке; для всех белков было предсказано 10 трансмембранных доменов (табл. 2).

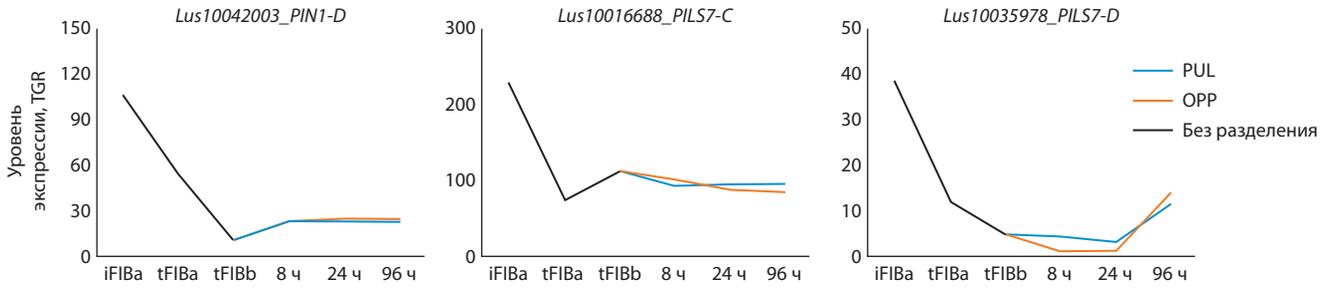
Гены, кодирующие *LusLAX2* (А и В), высоко экспрессировались в интрузивно растущих волокнах (iFIBa). Их экспрессия резко падала в волокнах, формирующих ТКС, и оставалась низкой при гравистимуляции (рис. 6).

Абсолютно отличную от *LusLAX2* динамику экспрессии имели *LusLAX3* (А и В). Динамика экспрессии между двумя паралогами была идентичной, как и в случае *LusLAX2*. Максимальный уровень экспрессии *LusLAX3* отмечен в волокнах, формирующих ТКС на поздней стадии (tFIBb). В ходе гравитовтета уровень экспрессии этих генов резко падал (рис. 7).

Гены *LusAUX1* имели относительно высокий уровень экспрессии во всех образцах. При этом четыре паралога показали четкое разделение на две группы по паттерну экспрессии: с максимальным уровнем в волокнах, формирующих ТКС (tFIBa, *LusAUX1-A*, *D*), и с максимальным уровнем экспрессии в волокнах гравистимулированных растений (OPP, 24 ч) (*LusAUX1-B*, *C*) (рис. 8).

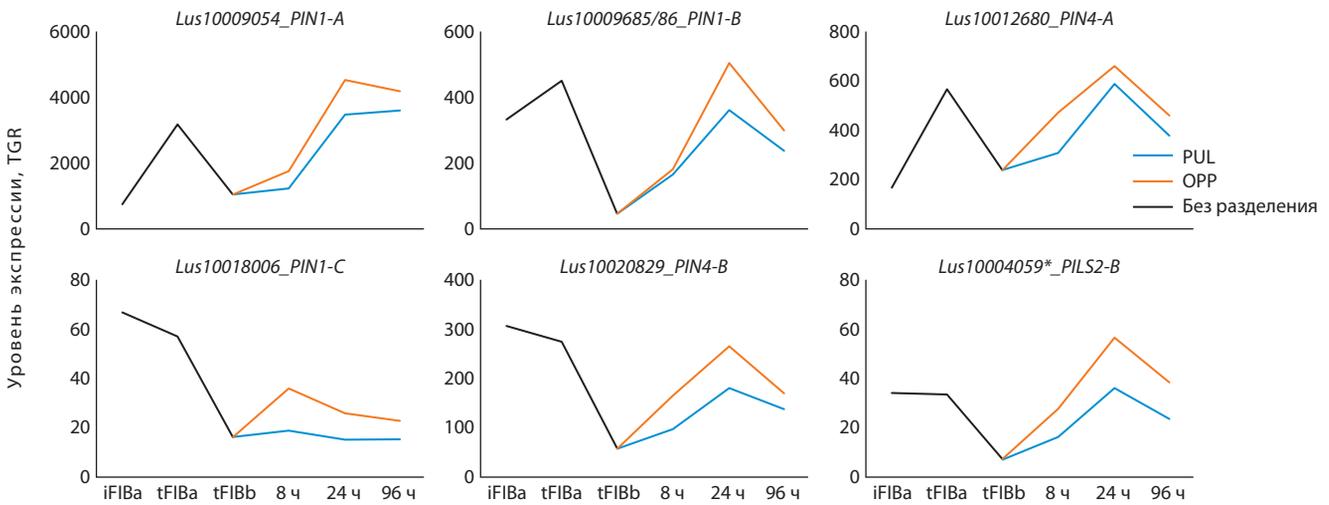
### Идентификация и экспрессия *LusABC*

Согласно базе данных Phytozome, в геноме льна присутствует 206 генов ABC транспортеров, из них 32 гена принадлежали группе В. Для анализа экспрессии мы отобрали ортологи перечисленных генов резуховидки во льне. Было выявлено 25 генов, соответствующих 5 генам-ортологам арабидопсиса: *ABC1* (2 гена льна), *ABC4* (4 гена льна), *ABC15* (9 генов льна), *ABC19* (8 генов льна), *ABC20* (2 гена льна). Последовательность *Lus10011977* была ча-

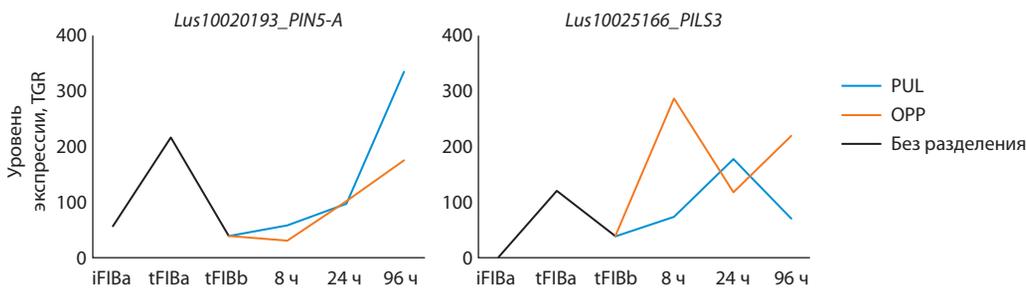


**Рис. 2.** Экспрессия *LusPIN/PILS*, имеющих повышенный уровень экспрессии только в интрузивно растущих волокнах.

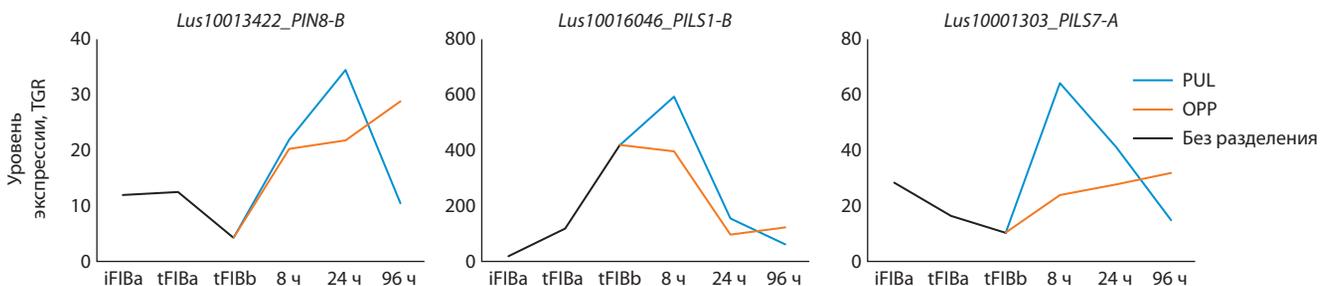
Здесь и на рис. 3–9: iFIBa – интрузивно растущие волокна; tFIBa – ранняя стадия формирования третичной клеточной стенки (ТКС); tFIBb – поздняя стадия формирования ТКС; 8, 24, 96 ч – время фиксации образцов после наклона стебля; TGR – total gene reads; PUL – pulling side (тянущая сторона); OPP – противоположная PUL-стороне; «без разделения» – растения не подвергали гравитимуляции, стебель не разделяли на PUL и OPP.



**Рис. 3.** Экспрессия *LusPIN1-A, B, C, LusPIN4-A, B, LusPILS2-B* в волокнах льна в норме и при гравитовете.



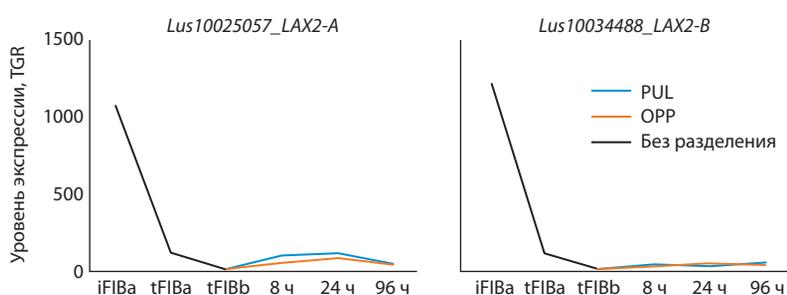
**Рис. 4.** Экспрессия *LusPIN5-A* и *LusPILS3* в волокнах льна в норме и при гравитовете.



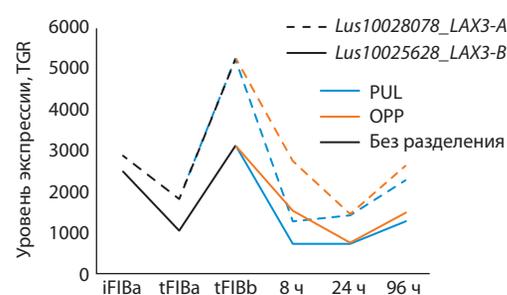
**Рис. 5.** Экспрессия *LusPIN8-B, LusPILS1-B, LusPILS7-A* в волокнах льна в норме и при гравитовете.

**Таблица 2.** Перечень и некоторые характеристики последовательностей LusAUX1/LAX

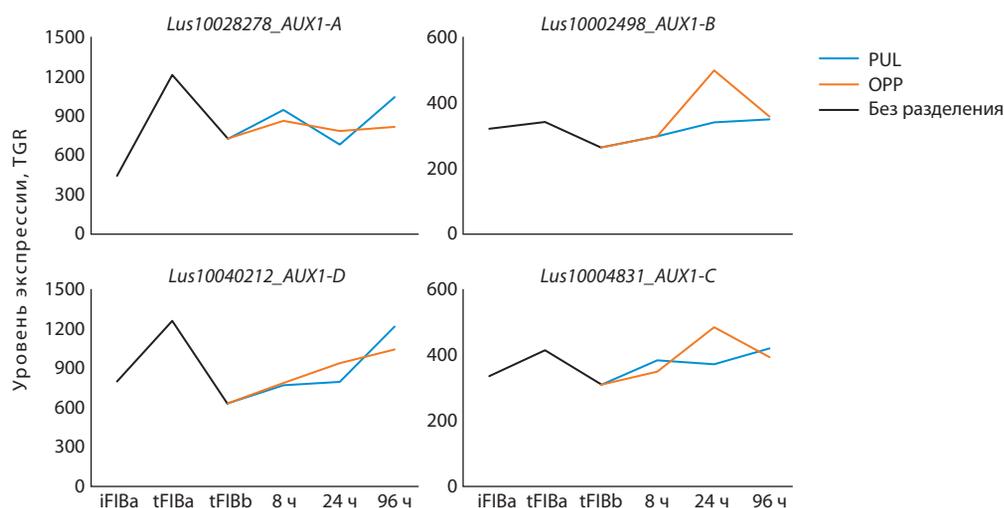
LUS	AT	Название для LUS	AA	Mw, кДа	pI	TMH_LUS
Lus10028278	AT2G38120	AUX1-A	628	70.0	7.2	10
Lus10002498	AT2G38120	AUX1-B	497	55.7	8.7	10
Lus10004831	AT2G38120	AUX1-C	487	54.7	8.7	10
Lus10040212	AT2G38120	AUX1-D	486	54.7	8.9	10
Lus10025057	AT2G21050	LAX2-A	497	55.6	8.5	10
Lus10034488	AT2G21050	LAX2-B	497	55.5	8.6	10
Lus10028078	AT1G77690	LAX3-A	477	53.7	8.7	10
Lus10025628	AT1G77690	LAX3-B	478	53.8	8.6	10



**Рис. 6.** Экспрессия LusLAX2-A, B в волокнах льна в норме и при гравитовете.



**Рис. 7.** Экспрессия LusLAX3-A, B в волокнах льна в норме и при гравитовете.



**Рис. 8.** Экспрессия LusAUX1-A, B, C, D в волокнах льна в норме и при гравитовете.

стично скорректирована, *Lus10036616* и *Lus10036617* объединены в одну последовательность (табл. 3). Из 24 генов четыре (*ABCВ4* и три изоформы *ABCВ15*) имели низкий уровень экспрессии или не экспрессировались.

Оставшийся 21 ген имел разный уровень и паттерн экспрессии. Так, *LusABCВ20* (A и B) отличались высоким уровнем экспрессии в растущих волокнах и на ранней стадии формирования ТКС, в зрелых волокнах их экспрессия снижалась и почти не менялась при гравитостимуляции. Две из четырех изоформ *LusABCВ4* имели максимальный уровень экспрессии в растущих волокнах, при этом сам

уровень экспрессии был невысоким, а третья изоформа имела пик экспрессии в волокнах на ранней стадии формирования ТКС. Наиболее разнообразные паттерны экспрессии были характерны для *LusABCВ19*, насчитывающего и наибольшее количество экспрессирующихся изоформ (8 генов) (данные не приводятся).

Мы отобрали *LusABCВ*, имеющие максимальную разницу в экспрессии между PUL- и OPP-образцами. Среди 6 генов четыре имели повышенную экспрессию в волокнах, формирующих ТКС. Экспрессия этих генов снижалась в более зрелых волокнах, но повышалась в волок-

**Таблица 3.** Перечень и некоторые характеристики последовательностей LusABCВ

LUS	AT	Название для LUS	AA	Mw, кДа	pI	ТМН_LUS
Lus10024162	AT3G28345	ABCВ15-E	1246	135.7	8.5	9
Lus10033470	AT3G28860	ABCВ19-F	1511	164.8	8.8	12
Lus10014427	AT2G36910	ABCВ1-A	1210	132.1	8.8	9
Lus10015595	AT3G28860	ABCВ19-G	1268	139.2	7.0	11
Lus10041565	AT3G28345	ABCВ15-B	1244	135.2	7.8	10
Lus10035834	AT3G28345	ABCВ15-H	1287	139.8	8.9	7
Lus10030674	AT3G28860	ABCВ19-B	1254	136.6	8.0	8
Lus10005249	AT3G28860	ABCВ19-A	1254	136.5	8.0	8
Lus10012959	AT3G28345	ABCВ15-D	1237	135.4	8.6	9
Lus10032911	AT3G28860	ABCВ19-H	1269	138.9	7.2	9
Lus10023437	AT3G55320	ABCВ20-A	1406	155.4	6.3	12
Lus10023929	AT2G36910	ABCВ1-B	1338	145.9	7.3	12
Lus10011977*	AT2G47000	ABCВ4-D	1072	117.4	8.3	2
Lus10038050	AT2G47000	ABCВ4-B	1216	131.1	8.4	9
Lus10013178*	AT3G28860	ABCВ19-D	2432	266.4	6.7	10
Lus10039533	AT3G28345	ABCВ15-F	1250	136.4	8.2	9
Lus10008139	AT3G28860	ABCВ19-C	1249	136.1	7.4	11
Lus10040315	AT3G55320	ABCВ20-B	1395	154.1	6.4	12
Lus10036616/17	AT3G28345	ABCВ15-G	1267	137.8	8.9	9
Lus10039458	AT3G28345	ABCВ15-A	1270	137.7	8.0	9
Lus10009989	AT2G47000	ABCВ4-C	1272	136.9	7.7	9
Lus10020905	AT3G28860	ABCВ19-E	1504	163.6	8.8	12
Lus10005839	AT3G28345	ABCВ15-C	1261	136.8	8.3	10
Lus10004520*	AT2G47000	ABCВ4-A	826	89.2	8.2	7

\* Последовательность может быть некорректной.

нах гравистимулированных растений, особенно в ОРР-образцах (достоверно для *LusABCВ15-B* и *LusABCВ19-B*) (рис. 9). Невысокий уровень экспрессии наблюдали для *LusABCВ15-B*, но при этом ген специфично активировался при гравистимуляции и практически не экспрессировался в других образцах. Экспрессия этого гена почти в пять раз выше в волокнах ОРР-стороны по сравнению с PUL (8, 24 ч) (см. рис. 9).

## Обсуждение

Действие ауксина как переключателя тесно связано с присутствием локальных максимумов и минимумов, генерируемых в тканях (Adamowski, Friml, 2015). Они создаются, поддерживаются и модулируются путем межклеточного переноса ауксина, специфичного для растения процесса. Этот процесс, называемый полярным переносом ауксина, зависит от действия представителей по меньшей мере трех семейств переносчиков ауксина: PIN-FORMED, AUX1/LAX и ABCВ (Geisler et al., 2017).

В данном исследовании в растениях льна идентифицированы основные гены переносчиков ауксина: 12 *LusPIN*,

15 *LusPILS*, 8 *LusAUX1/LAX* и 24 *LusABCВ*. В результате сравнительного анализа экспрессии этих генов во флоэмных волокнах льна, находящихся на разных стадиях развития, была выявлена повышенная экспрессия некоторых из них на стадии интрузивного роста (*LusLAX2* (A, B), *LusPIN1-D*, *LusPILS7* (C, D)), на ранней стадии формирования ТКК (*LusAUX1* (A, D), *LusABCВ1-A*, B, *LusABCВ15-A*, *LusPIN1-A*, B, *LusPIN4-A*, *LusPIN5-A*) и на поздней стадии формирования ТКК (*LusLAX3* (A, B)).

Как известно, все транспортеры ауксина упрощенно можно разделить на три группы: ответственные за приток ауксина в клетку, отток из клетки и транспорт внутри клетки. В оттоке ауксина из клетки принимают участие два типа переносчиков – PIN-белки и ABCВ-переносчики (Zařimalová et al., 2010). Классификация белков PIN, как правило, основана на филогенетических взаимоотношениях, субклеточной локализации и длине доменов гидрофильной петли. С этой точки зрения члены семейства белков PIN обычно группируются в три типа: 1) канонические (PIN1, 2, 3, 4 и 7 для резуховидки), локализованные на плазмалемме (ПМ), которые опосредуют межклеточный

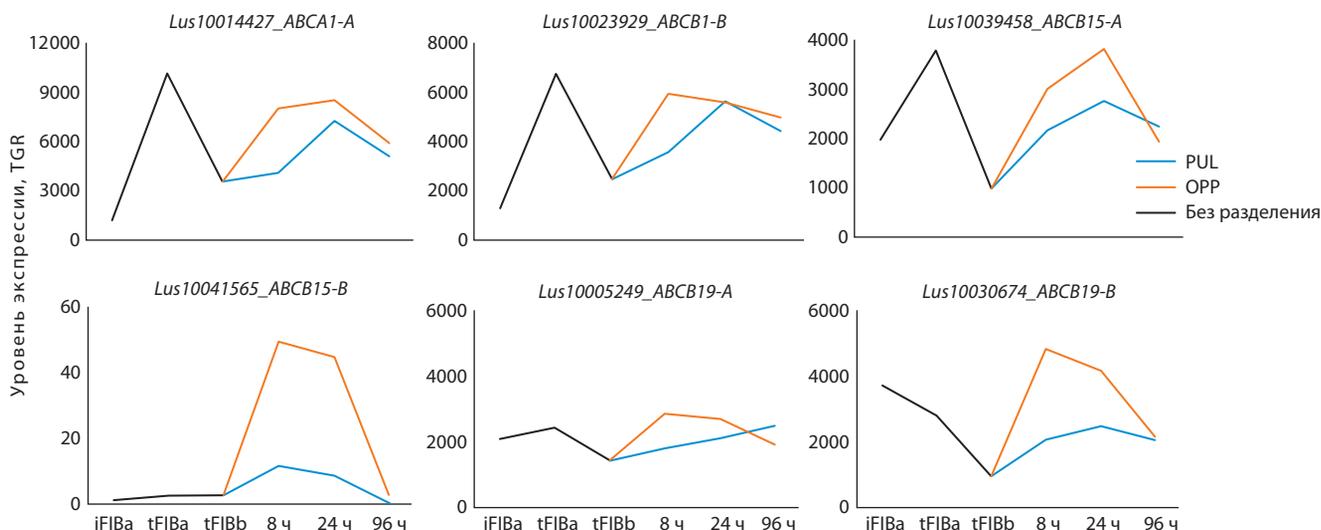


Рис. 9. Экспрессия некоторых изоформ *LusABC1*, 15, 19 в волокнах льна в норме и при гравитовете.

поток ауксина; 2) неканонические (PIN5 и 8 для резуховидки), которые локализуются на мембране ЭПР и опосредуют обмен ауксином между цитозолем и полостью ЭПР, способствуя внутриклеточному гомеостазу ауксина; 3) двойные, ПМ- и ЭПР-локализованные PIN, такие как PIN6 в резуховидке, с неясной функцией (Zhang et al., 2020). По результатам, полученным в настоящем исследовании, по PIN-переносчикам наблюдалась следующая тенденция: гены канонических *LusPIN* высоко экспрессировались в волокнах на стадии начала формирования ТКС (см. рис. 3) и при гравитовете. При этом их повышенная экспрессия наблюдалась в OPP-образцах (см. рис. 3), тогда как повышенная экспрессия генов неканонических PIN наблюдалась в PUL-образцах (см. рис. 4 и 5), что дает нам возможность предположить перераспределение содержания ауксина в волокнах на разных сторонах стебля при гравитовете. В подтверждение этого предположения подобная тенденция проявляется и в отношении ABCB-переносчиков (см. рис. 9): показана более высокая экспрессия *LusABC1*, 15 и 19 в OPP-образцах. ABCB-переносчики осуществляют транспорт за счет непосредственного связывания АТФ и энергии, которая высвобождается при гидролизе АТФ, и могут функционировать при снижении хемосмотических градиентов, или когда ауксин должен двигаться против градиента (Zařimalová et al., 2010). Арабидопсис содержит 21 полноразмерный ген *ABCB* (Kang et al., 2011), но пока только для четырех изоформ – *ABCB1*, *ABCB4*, *ABCB19* и *ABCB21* – были получены достоверные данные о переносе ауксина; для *ABCB1* и *ABCB19* получена информация о согласованном действии при гравитропизме (Geisler et al., 2017). Также недавно было показано, что пары *ABCB1/19* и *ABCB6/20* представляют собой основные переносчики ауксина *ABCB* на дальние расстояния по проводящей системе у арабидопсиса (Jeness et al., 2022). Есть предположение, что *ABCB14* и *ABCB15* вовлечены в перенос ауксина в ходе лигнификации стебля (Kaneda et al., 2011). Надо отметить, что экспрессия генов ABCB-транспортеров в проростках арабидопсиса исследовалась в корнях, гипокотиле

и апексе побега (Geisler et al., 2017). Предполагают, что ABCB могут играть роль основных переносчиков ауксина: равномерно локализованы на ПМ, обычно обнаруживаются у различных видов растений и стабильно сохраняются независимо от внутренних и внешних сигналов. Напротив, PIN асимметрично локализованы и динамично распределяются в ответ на эндогенные и экзогенные сигналы (Cho M., Cho H.T., 2013).

Необходимо отметить, что в нашем исследовании были идентифицированы два паралога, гомологичные кладе *AtPIN3/4/7* (см. рис. 1), которые аннотированы нами по ближайшему гомологу как *LusPIN4* (А и В). Известно, что PIN3 обеспечивает латеральный перенос ауксина (Friml et al., 2002; Rakusová et al., 2019), показана высокая экспрессия *PIN3* в зрелых волокнах рами, имеющих утолщенную третичную клеточную стенку (Bao et al., 2019), и при формировании древесины натяжения (Gerttula et al., 2015). В данном исследовании гены *LusPIN4* (А и В) достоверно повышали экспрессию при гравитостимуляции (24 ч) (см. рис. 3), но экспрессия в волокнах OPP-образцов была немного выше по сравнению с PUL-образцами. Похожая тенденция была получена в результате анализа экспрессии генов и мембранной локализации *AtPIN3* и *AtPIN4* при формировании апикального крючка гипокотыля, где тоже наблюдается выпуклая и вогнутая сторона. Авторы предположили, что увеличение содержания PIN3 и PIN4 в клеточной мембране на выпуклой стороне является решающим фактором для формирования локального максимума ауксина на вогнутой стороне (Zhu et al., 2019). Отметим, что мы исследовали область стебля взрослого растения, где волокна не растут растяжением и формируется второй (расположенный ниже) изгиб. Ранее мы показали, что при удалении верхней части стебля (где формируется верхний изгиб) растения не менее успешно реализуют гравитропическую реакцию (Ibragimova et al., 2017).

Из полученных здесь результатов следует, что у генов *AUX1/LAX*, ответственных за приток ауксина в клетку, повышалась экспрессия во время гравиреакции до уровня экспрессии в волокнах на ранней стадии формирования

ТКС (*LusAUX1-D* для PUL), но достоверного отличия между ОРР и PUL не наблюдалось (см. рис. 8). Однако очень интересен тот факт, что высокоэкспрессирующиеся гены *Lus10028078* и *Lus10025628* (*ATIG77690 – LAX3*) имели единственный максимум в контрольных образцах на поздней стадии формирования ТКС (см. рис. 7). Эти данные согласуются с высокой экспрессией аналогичных генов, которая отмечается в зрелых волокнах рами (Бао et al., 2019). При гравитовете экспрессия этих генов падала и незначительно возрастала к концу реакции, приближаясь к значениям в фазу начала формирования ТКС (см. рис. 7). Для *LAX2* наблюдали другой эффект: максимум экспрессии в волокнах приходился в фазу интрузивного роста, но, как и для *LAX3* и *AUX1*, при гравитовете значения экспрессии вновь были близки к величинам на ранней стадии формирования ТКС (достоверно для гена *LusLAX2-A* на PUL-стороне) (см. рис. 6).

Согласно результатам нашего исследования, повышенная экспрессия *LusPILS* в волокнах часто имела место при гравитовете – в волокнах как PUL-, так и ОРР-стороны (см. рис. 4 и 5), что позволяет предположить наличие связи между гравиреакцией и внутриклеточным перераспределением ауксина в целом. При этом в некоторых случаях наблюдалось достоверное отличие в волокнах на разных сторонах стебля (*LusPILS3* и *LusPILS7-A*) (см. рис. 4 и 5). Следует отметить, что у *LusPILS7-C* и *D* высокая экспрессия была только на стадии интрузивного роста волокон (см. рис. 2). PILS-переносчики были идентифицированы *in silico* как предполагаемое семейство посредников переноса ауксина; показано, что PILS, в том числе *PILS3* и *PILS7*, регулируют накопление ауксина в клетке, удерживая добавленный ауксин (Barbez et al., 2012), что, возможно, происходит и в случае гравистимуляции.

Таким образом, в настоящей работе было показано, что при гравитропической реакции наиболее ярко экспрессировались гены, кодирующие транспортеры, ответственные за отток ауксина из клетки (*PIN* и *ABCB*) и внутриклеточный транспорт, отвечающие за гомеостаз ауксина (неканонические *PIN5*, *PIN8* и *PILS*). Уровень экспрессии этих генов часто приближался к величинам, которые были характерны для стадии начала формирования ТКС, когда биосинтетические процессы протекают более интенсивно по сравнению с таковыми в зрелых волокнах. При гравитропизме повышалась экспрессия и генов транспортеров, отвечающих за приток ауксина в клетки (*LusAUX1-D*). Выявлена дифференциальная экспрессия генов переносчиков ИУК в волокнах, находящихся на разных сторонах стебля: различие наблюдалось за счет экспрессии генов, продукты которых отвечают за внутриклеточный транспорт (*LusPILS3*, *LusPILS7-A*) и отток ауксина (*LusABCB15-B*, *LusABCB19-B*); повышенная экспрессия *PIN*-генов и *ABCB*-генов была более типична для волокон ОРР-стороны стебля.

## Заключение

В данном исследовании в растениях льна идентифицированы основные гены переносчиков ауксина: 8 *LusAUX1/LAX*, 12 *LusPIN-FORMED*, 15 *LusPIN-LIKES* и 24 *LusABCB*. Выявлена дифференциальная экспрессия генов переносчиков ИУК на разной стадии развития и в волокнах, нахо-

дящихся на разных сторонах стебля при гравитовете. Мы предполагаем, что реализация гравиреакции может быть связана с асимметричным перераспределением ауксина, главным образом за счет внутриклеточных транспортеров и транспортеров оттока ауксина из клетки, повышение экспрессии генов которых мы наблюдали при гравиреакции. Для выяснения механизмов участия ауксина в реализации гравитовета, не связанного с ростом растяжением, наряду с участием в нем других гормонов, требуются дальнейшие исследования.

## Список литературы / References

- Adamowski M., Friml J. PIN-dependent auxin transport: action, regulation, and evolution. *Plant Cell*. 2015;27(1):20-32. DOI 10.1105/tpc.114.134874
- Bao Y., Huang X., Rehman M., Wang Y., Wang B., Peng D. Identification and expression analysis of the PIN and AUX/LAX gene families in ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaud). *Agronomy*. 2019;9:435. DOI 10.3390/agronomy9080435
- Barbez E., Kubeš M., Rolčík J., Béziat C., Pencik A., Wang B., Rosquete M.R., Zhu J., Dobrev P.I., Lee Y., Zažímalová E., Petrášek J., Geisler M., Friml J., Kleine-Vehn J. A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants. *Nature*. 2012;485(7396):119-122. DOI 10.1038/nature11001
- Cho M., Cho H.T. The function of ABCB transporters in auxin transport. *Plant Signal. Behav.* 2013;8(2):e22990. DOI 10.4161/psb.22990
- Evans M.L. Gravitropism: interaction of sensitivity modulation and effector redistribution. *Plant Physiol.* 1991;95(1):1-5. DOI 10.1104/pp.95.1.1
- Friml J., Wiśniewska J., Benkova E., Mendgen K., Palme K. Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature*. 2002;415(6873):806-809. DOI 10.1038/415806a
- Geisler M., Aryal B., Donato M., Hao P.A. Critical view on ABC transporters and their interacting partners in auxin transport. *Plant Cell Physiol.* 2017;58(10):1601-1614. DOI 10.1093/pcp/pcx104
- Gerttula S., Zinkgraf M., Muday G., Lewis D., Ibatullin F., Brumer H., Hart F., Mansfield S., Filkov V., Groover A. Transcriptional and hormonal regulation of gravitropism of woody stems in *Populus*. *Plant Cell*. 2015;27(10):2800-2813. DOI 10.1105/tpc.15.00531
- Gorshkova T.A., Sal'nikov V.V., Chemikosova S.B., Ageeva M.V., Pavlencheva N.V. The snap point: a transition point in *Linum usitatissimum* bast fiber development. *Ind. Crops Prod.* 2003;18(3):213-221. DOI 10.1016/S0926-6690(03)00043-8
- Harrison M.A., Pickard B.G. Auxin asymmetry during gravitropism by tomato hypocotyls. *Plant Physiol.* 1989;89(2):652-657. DOI 10.1104/pp.89.2.652
- Haygreen J.G., Bowyer J.L. Forest Products and Wood Science. Wiley-Blackwell, 1996
- Hellgren J.M., Olofsson K., Sundberg B. Patterns of auxin distribution during gravitational induction of reaction wood in poplar and pine. *Plant Physiol.* 2004;135(1):212-220. DOI 10.1104/pp.104.038927
- Ibragimova N.N., Ageeva M.V., Gorshkova T.A. Development of gravitropic response: unusual behavior of flax phloem G-fibers. *Protoplasma*. 2017;254(2):749-762. DOI 10.1007/s00709-016-0985-8
- Ibragimova N., Mokshina N., Ageeva M., Gurjanov O., Mikshina P. Rearrangement of the cellulose-enriched cell wall in flax phloem fibers over the course of the gravitropic reaction. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(15):5322. DOI 10.3390/ijms21155322
- Jenness M.K., Tayengwa R., Bate G.A., Tapken W., Zhang Y., Pang C., Murphy A.S. Loss of multiple ABCB auxin transporters recapitulates the major twisted dwarf 1 phenotypes in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 2022;13:840260. DOI 10.3389/fpls.2022.840260
- Jourez B., Riboux A., Leclercq A. Anatomical characteristics of tension wood and opposite wood in young inclined stems of poplar (*Popu-*

- lus euramericana* cv 'Ghoy'). *IAWA J.* 2001;22(2):133-157. DOI 10.1163/22941932-90000274
- Kaneda M., Schuetz M., Lin B.S., Chanis C., Hamberger B., Western T.L., Ehling J., Samuelset A.L. ABC transporters coordinately expressed during lignifications of *Arabidopsis* stems include a set of ABCBs associated with auxin transport. *J. Exp. Bot.* 2011;62(6):2063-2077. DOI 10.1093/jxb/erq416
- Kang J., Park J., Choi H., Burla B., Kretzschmar T., Lee Y., Martinoia E. Plant ABC transporters. *Arabidopsis Book.* 2011;9:e0153. DOI 10.1199/tab.0153
- Li Y., Hagen G., Guilfoyle T.J. An auxin-responsive promoter is differentially induced by auxin gradients during tropisms. *Plant Cell.* 1991;3(11):1167-1175. DOI 10.1105/tpc.3.11.1167
- Manna M., Rengasamy B., Ambasht N.K., Sinha A.K. Characterization and expression profiling of PIN auxin efflux transporters reveal their role in developmental and abiotic stress conditions in rice. *Front. Plant Sci.* 2022;13:1059559. DOI 10.3389/fpls.2022.1059559
- 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;231(2):512-515. DOI 10.1111/nph.17405
- Rakusová H., Han H., Valošek P., Friml J. Genetic screen for factors mediating PIN polarization in gravistimulated *Arabidopsis thaliana* hypocotyls. *Plant J.* 2019;98(6):1048-1059. DOI 10.1111/tpj.14301
- Swarup R., Péret B. AUX/LAX family of auxin influx carriers – an overview. *Front. Plant Sci.* 2012;3:225. DOI 10.3389/fpls.2012.00225
- Timell T.E. The chemical composition of tension wood. *Svensk Papperstidning.* 1969;72:173-181
- Young G.B., Jack D.L., Smith D.W., Saier M.H., Jr. The amino acid/auxin:proton symport permease family. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999;1415(2):306-322. DOI 10.1016/s0005-2736(98)00196-5
- Zažimalová E., Murphy A.S., Yang H., Hoyerová K., Hošek P. Auxin transporters – why so many? *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010;2(3):a001552. DOI 10.1101/cshperspect.a001552
- Zhang Y., Hartinger C., Wang X., Friml J. Directional auxin fluxes in plants by intramolecular domain-domain coevolution of PIN auxin transporters. *New Phytol.* 2020;227(5):1406-1416. DOI 10.1111/nph.16629
- Zhu Q., Gallemí M., Pospíšil J., Žádníková P., Strnad M., Benková E. Root gravity response module guides differential growth determining both root bending and apical hook formation in *Arabidopsis*. *Development.* 2019;146(17):dev175919. DOI 10.1242/dev.175919

---

#### ORCID

N.E. Mokshina orcid.org/0000-0002-6434-7404

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 23-24-00612.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 26.07.2023. После доработки 15.11.2023. Принята к публикации 16.11.2023.