



УДК 54.061

ПОИСК И ИДЕНТИФИКАЦИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ РАСТЕНИЙ

© 2025 г. А. Ю. Скрипников*, #, Е. Е. Воробьева*, М. Э. Тальянский**, Н. О. Калинина**

* Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
Россия, 119234 Москва, ул. Ленинские горы, 1с12

** ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 19.05.2025 г.

После доработки 30.05.2025 г.

Принята к публикации 01.06.2025 г.

Регуляторные пептиды растений – новый класс сигнальных молекул, играющих ведущую роль в регуляции роста, развития и стрессовых реакций растений. Благодаря высокой биологической активности при низких концентрациях, они рассматриваются как перспективные биостимуляторы для экологически безопасного растениеводства. В обзоре рассматриваются основные теоретические подходы и экспериментальные методы поиска и идентификации таких пептидов, включая масс-спектрометрию, биоинформатику, биотесты и *in silico* скрининг. Приводится обзор ключевых открытых пептидов, таких как системин, PSK, PSY, AtPep1, CLV3, TDIF, CEP, CIF, а также описываются методы их выделения, синтеза и функциональной валидации. Особое внимание уделяется модельным системам на основе культур клеток и проростков, применяемым для скрининга активности пептидов, а также подходам к идентификации соответствующих рецепторов. Авторы подчеркивают значение биотестов как ключевого этапа стратегий поиска, обеспечивающего функциональную оценку как идентифицированных, так и предсказанных (putative) пептидов.

Ключевые слова: пептиды растений, масс-спектрометрия, предполагаемые пептиды, регуляторные пептиды, анализ роста корней, сигнальные пептиды

DOI: 10.31857/S0132342325050022

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	744
2. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ РАСТЕНИЙ	746
3. БИОТЕСТЫ ПЕПТИДНЫХ ФРАКЦИЙ И СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ	747
3.1. Корневые тесты	747
3.2. Клеточные тесты	747
3.3. Стрессовые тесты	748
4. МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ – БАЗОВЫЙ ИНСТРУМЕНТ ПОИСКА И ИДЕНТИФИКАЦИИ ПЕПТИДОВ	749

Сокращения: ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография – аналитический метод разделения и количественного определения химических соединений; LC-MS/MS – жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией; MALDI-TOF-MS/MS – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с tandemной времяпролетной масс-спектрометрией; RGA – тест на рост корней; LRR – лейцин-богатый повтор; RTK – рецепторная тирозинкиназа; RLK – рецептор-подобная киназа; SBT – субтилизин-подобная сериновая протеиназа; AtPep1 – 23-аминокислотный пептид, выделенный из экстрактов листьев *Arabidopsis*, проявляющий свойства эндогенного элиситора врожденного иммунного ответа, первый представитель семейства пептидов-элиторов растений (Pep); CEP – пептид, кодируемый С-концевой областью; CIF – фактор целостности полосок Каспари 1; CLE – пептиды, родственные CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION; CLEL – CLE-подобный пептид; GLV – пептид GOLVEN; HypSys – системин, богатый гидроксипролином; Pep – пептид-элиситор растений; RALF – фактор быстрого защелачивания; RGF – пептидный фактор роста корневой меристемы; PSY – растительный пептид, содержащий сульфатированный тирозин; TDIF – пептиды, ингибирующие дифференцировку трахеальных элементов.

Автор для связи: (тел.: +7 (495)-939-12-68; эл. почта: deptbioorg@gmail.com).

5. СТРАТЕГИИ ПОИСКА И ИДЕНТИФИКАЦИИ НОВЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ РАСТЕНИЙ	749
6. ПОИСК РЕЦЕПТОРОВ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ	752
7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	753
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	754

1. ВВЕДЕНИЕ

Биологически активные пептиды растений, в отличие от пептидов животных и человека, были открыты сравнительно недавно [1, 2]. В настоящее время растительные пептиды рассматриваются как ведущие низкомолекулярные регуляторы роста и защитных реакций, в одном ряду с основными фитогормонами ауксином, цитокининами, гиббереллинами, брассиностероидами и жасмонатом. В литературе пептиды определяются как аминокислотные линейные полимеры, содержащие не более 50 остатков аминокислот, с молекулярной массой от 5 до 6 кДа [3]. Некоторые исследователи расширяют это определение, включая в пептиды полимеры аминокислот длиной до 100 аминокислотных остатков [1, 4]. Регуляторные пептиды растений представлены, как правило, короткими пептидами длиной от 5 до 20 аминокислотных остатков, в отдельных случаях они достигают размеров 50-аминокислотных полимеров с массой 5–6 кДа [1]. Изучение функционально активных пептидов растений актуально не только в фундаментальном, но и в прикладном плане, поскольку они могут использоваться в сельском хозяйстве как агропрепараты на основе синтетических пептидов, направленные на повышение

продуктивности и устойчивости растений экологически безопасным способом [5–7].

В 1991 г. в ходе изучения молекулярных механизмов устойчивости томатов к насекомым-вредителям был открыт системин – сигнальный пептид, состоящий из 18 аминокислот, который индуцирует системную устойчивость у растений семейства пасленовых (*Solanaceae*) [8]. Это открытие стало отправной точкой для активного поиска, идентификации и изучения регуляторных пептидов растений [2]. Новые регуляторные и сигнальные пептиды были выявлены в ходе очистки пептидных фракций из растительных экстрактов под контролем тестов на биологическую активность (рис. 1, табл. 1) [9–14]. Ключевую роль в расшифровке аминокислотной последовательности пептидов играет масс-спектрометрия, выступая не только как аналитический метод, но и как поисковый инструмент на биоинформационных платформах. Для валидации биологической активности и функций новых пептидов проводят модельные эксперименты с использованием культур клеток и проростков растений *in vitro*, которые стали незаменимым и универсальным этапом исследований по их поиску и функциональной характеристике [14].

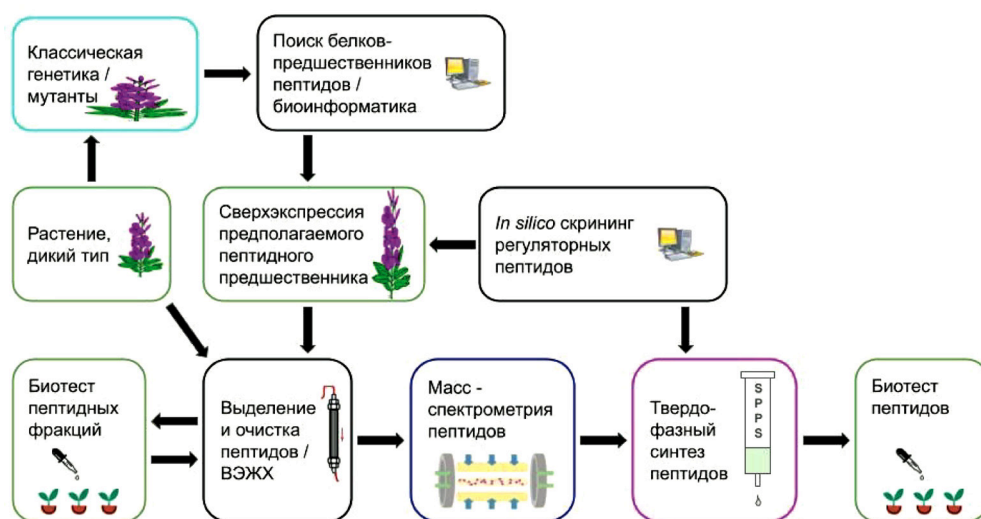


Рис. 1. Стратегия и схема поиска и характеристики новых регуляторных пептидов растений. Биотесты используются в качестве аналитических инструментов для биотест-направленной очистки пептидов, оценки биологической активности синтетических пептидов.

Таблица 1. Регуляторные пептиды растений, их рецепторы и функции

Пептид, аминокислотная последовательность, вид растения	Биологическая функция	Рецептор
Системин [8] AVQSK PPSKRDPP KMQTD <i>Solanum lycopersicum</i>	Регуляция системного ответа на нападение фитофагов	SYR1 [81, 82]
PSK (Phytosulfokine) [9] YIYTQ <i>Asparagus officinalis</i>	Регуляция деления и роста клеток	PSKR1 [83] PSKR2 [10]
PSY1 (Plant peptide containing sulfated tyrosine 1) [10] DYGDPSANPKHDPGVPPS <i>Arabidopsis thaliana</i>	Регуляция деления и роста клеток	PSY1R [88]
CLV3 (CLAVATA3) [36, 90] RTVPSGPDPLHH <i>Arabidopsis thaliana</i>	Регуляция пролиферации клеток в меристеме	CLV1 [57]
TDIF (Tracheary element differentiation inhibitory factor) [36] HEVPSGPNPISN <i>Zinnia elegans</i>	Регуляция дифференцировки сосудистых клеток	PXY [78]
HypSys (Hydroxyproline-rich systemins) [11] RGANLPPSPASSPPSKE <i>Nicotiana tabacum</i>	Регуляция стрессовых и защитных реакций	нет данных
RALF * (Rapid alkalization factor) [12] ATKKYISYGALQKNSVPCSRRGASY-YNCKPGAQAN-PYSRGCSAITRCRS <i>Nicotiana tabacum</i>	Регуляция роста, развития и стрессовых реакций	FER [12]
<i>AtPep1</i> (Plant elicitor peptide) [13] ATKVKAKQRGKEKVSSGRPGQHN <i>Arabidopsis thaliana</i>	Активация сигнальных путей, связанных со стрессовыми и защитными реакциями	PEPR1 [87]
CLE44 (CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION-related 44) [38] HEVPSGPNPISN <i>Arabidopsis thaliana</i>	Регуляция дифференцировки сосудистых клеток	PXY [78]
CEP1 (C-terminally encoded peptide) [38] DFRPTNPGNSPGVGH <i>Arabidopsis thaliana</i>	Рост и развитие корней	CEPR1 CEPR2 [89]
RGF1 (Root meristem growth factor 1) [49] DYSNPPGHHPPRHN <i>Arabidopsis thaliana</i>	Рост и развитие корней	RGRF1 RGFR2 RGFR3 [85]
CIF1 (Casparian strip integrity factor 1) [74] DYGNNSPSRLRPPFKLIPN <i>Arabidopsis thaliana</i>	Стимуляция отложения лигнина и укрепление структурной целостности эндодермального слоя	GSO1/ SGN3 [74]

* 49-аминокислотная последовательность пептида RALF занимает две строки. В пептидных последовательностях жирным шрифтом выделены посттрансляционные модификации: гидроксирование пролина и сульфатирование тирозина.

Примечательно, что растительные регуляторные пептиды, открытые в ранние годы, обладают значительным прикладным потенциалом в настоящее время. Более того, они служат фундаментом для современных исследований в области пептидной регуляции растений, выступая в роли референсных последовательностей для биоинформатического поиска их ортологов в разнообразных семействах высших растений – так называемых предполагаемых (putative) регуляторных пептидов, предсказанных на основе геномных и транскриптомных данных. В качестве примеров фундаментальных растительных пептидов, идентифицированных на ранних этапах исследований и продолжающих оставаться в центре внимания, можно привести следующие группы:

— регуляторы пролиферации клеток, такие как фитосульфокин (PSK) – пептид из 5 аминокислот [9, 15], и PSY1 (Plant peptide containing sulfated tyrosine 1) – 18-аминокислотный пептид [10, 16];

— защитные пептиды, такие как системин [17–23], HupSys (гидроксипролин-содержащий системин, 18 аминокислот) [11, 24], AtPep1 – 23-аминокислотный пептид из листьев *Arabidopsis*, обладающий свойствами эндогенного активатора врожденного иммунного ответа [13, 25–30], и RALF (фактор быстрого подщелачивания) – пептид из 49 аминокислот [31, 32];

— регуляторы апикальной меристемы, такие как CLV3 (CLAVATA3) – 12-аминокислотный пептид и другие представители семейства CLE (CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION-related) [33–37], включая факторы дифференцировки сосудистых стеловых клеток додекапептиды TDIF и CLE41/44 [14, 38], а также регулятор роста корней CER1 [38, 39] (см. табл. 1).

Высокопроизводительная масс-спектрометрия позволяет идентифицировать сотни и тысячи пептидов в экстрактах из растений [40, 41]. Методы биоинформатики, в свою очередь, дают возможность находить множественные гомологи и ортологи регуляторных пептидов, используя в качестве исходных последовательностей функционально охарактеризованные пептиды растений [14, 42, 43].

Несмотря на заметный рост числа работ и публикаций, посвященных изучению пептидов растений, фактическое количество пептидов, которые были выделены, идентифицированы методом масс-спектрометрии и функционально

охарактеризованы как регуляторные, остается сравнительно небольшим. Число инструментально верифицированных пептидов, примеры которых приведены выше или в табл. 1, увеличивалось в последние годы лишь единичными темпами. В настоящее время исследования по регуляторным пептидам растений в основном сосредоточены на изучении предполагаемых (putative) пептидов, предсказанных на основе известных последовательностей пептидов, которые были идентифицированы масс-спектрометрически и охарактеризованы при помощи биотестов в прошлые годы.

Высокопроизводительная tandemная масс-спектрометрия LC-MS/MS открывает широкие возможности для составления пептидомов, качественной и количественной представленности нативных пептидов в биологических образцах. При этом возникает проблема валидации индивидуальных пептидов в составе обширных пептидомных баз данных по биологической активности, которая служит ключевым критерием оценки их функциональной роли.

В настоящем обзоре рассматриваются базовые методы биофункциональной оценки пептидов растений, которые сыграли решающую роль в установлении установленных пептидных биорегуляторов, а также основные стратегии поиска и идентификации регуляторных пептидов.

2. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ РАСТЕНИЙ

На протяжении жизненного цикла растения представленность нативных пептидов в клетках и тканях существенно варьирует, при этом их содержание остается на крайне низком уровне, часто остающимся за пределами чувствительности детекторов не только ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии), но и масс-спектрометров [6, 44]. В связи с этим возникают серьезные технические проблемы для их выделения и очистки, которые часто превращаются в непреодолимые барьеры на пути открытия новых пептидных регуляторов и идентификации предполагаемых гомологов установленных функциональных пептидов в составе растительных экстрактов [24, 44, 45].

Для выделения и очистки пептидов из растительных экстрактов используют препаративные схемы, основанные на высокоэффективной жидкостной хроматографии на обращенной фазе

C18 [8–10, 13, 14] (рис. 1). Биотест-управляемая очистка (bioassay-guided purification) широко использовалась для тестирования биологической активности пептидов в процессе их ВЭЖХ-фракционирования при выделении целого ряда хорошо известных регуляторных пептидов растений начиная с первого растительного пептида системина (см. рис. 1–2 и табл. 1) [8, 9, 11–13].

Суспензионные культуры клеток [9, 13], изолированные корни [45] и целые растения, погруженные в жидкую питательную среду [38], использовались для упрощения и сокращения числа этапов очистки пептидов. Такой подход позволяет обойти препаративное разрушение тканей, а также этапы экстракции и фракционирования, поскольку пептиды, секретируемые в культуральную жидкость, выделяются непосредственно из нее с помощью фенольной экстракции и обращенно-фазовой хроматографии. Эффективным решением в рамках данного метода стало использование трансгенных растений, сверхэкспрессирующих гены белков-предшественников пептидов. Это, по мнению авторов, обеспечивает повышение содержания целевых пептидов в среде культивирования, откуда они могут быть непосредственно выделены с помощью обращенно-фазовых картриджей или хроматографических колонок [38, 45].

3. БИОТЕСТЫ ПЕПТИДНЫХ ФРАКЦИЙ И СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ

Несмотря на то, что исследование многих предполагаемых пептидов часто не доходит до стадии идентификации их рецепторов и сигнальных путей, проведение биологических тестов с синтетическими пептидами – необходимый этап для изучения их функциональной роли. Новые пептиды исследуют на предмет биологической активности с использованием традиционных биотестов и специально разработанных модельных клеточных систем. Эти тесты включают экзогенное воздействие на клетки и проростки с помощью водных растворов пептидов в концентрационном диапазоне от пикомолярных до микромолярных значений. Твердофазный синтез коротких пептидов с аминокислотной последовательностью, аналогичной выделенным или предполагаемым пептидам, – необходимый этап экспериментов по тестированию новых растительных пептидов. В модельных экспериментах синтетические пептиды могут добавляться в питательную среду клеточных культур или наноситься на растения в

виде листовых опрыскиваний в вегетационных и полевых экспериментах (см. табл. 1) [8, 14, 36].

3.1. Корневые тесты

Традиционный метод изучения проростков *Arabidopsis* на вертикально ориентированных чашках Петри стал стандартным подходом при изучении различных физиологических процессов у растений [46, 47]. Данный метод широко применяется для изучения роста и развития корней *Arabidopsis*, поэтому он получил название “тест на рост корней” (root growth assay, RGA) [48].

После идентификации додекапептидов CLV3 у *Arabidopsis* [36] и TDIF у бархатцев (*Zinnia*) [14], 25 предполагаемых пептидов семейства CLE у *Arabidopsis*, были синтезированы методом твердофазного синтеза как 12-аминокислотные пептиды и изучены при помощи RGA. Корневой тест на основе проростков *Arabidopsis* представляет собой чувствительный, простой и универсальный метод для скрининга новых растительных пептидов [14, 36]. Он сыграл ключевую роль в открытии таких семейств регуляторных пептидов растений, как PSY [10], CEP [38] и RGF/CLEL/GLV [49–52].

3.2. Клеточные тесты

Для тестирования новых растительных пептидов широко используются каллусные и суспензионные культуры клеток. Для идентификации таких пептидов, как PSK, PSY1, HypSys, RALF, AtPep1 и TDIF клеточные тест-культуры сыграли решающую роль (см. табл. 1, рис. 2) [8–14].

Пептид PSK был открыт в ходе поиска цитокинетических регуляторов в жидкой среде, кондиционированной в процессе суспензионного культивирования изолированных мезофилльных клеток спаржи (*Asparagus officinalis* L.). Каллусная культура клеток *Arabidopsis* была использована как тест-система для определения цитокинетической активности сульфатированного октадекапептида PSY1. Интересно отметить, что способность пептида PSY1 из арабидопсиса вызывать деление растительных клеток была подтверждена в экспериментах с использованием клеточной культуры спаржи (*Asparagus officinalis* L.) [10]. Данный пример показывает, что культивируемые клетки спаржи могут служить универсальной модельной системой для изучения биологической активности новых пептидов из разных таксономических групп растений.

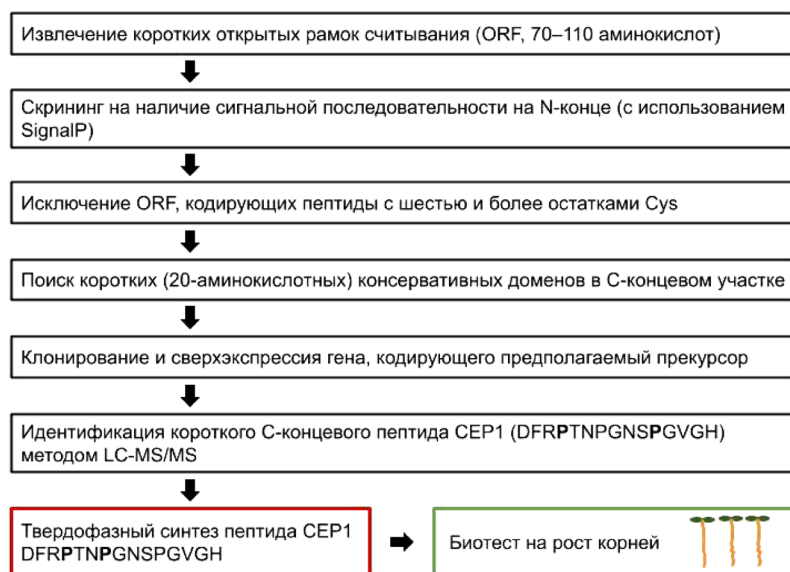


Рис. 2. Алгоритм *in silico* скрининга коротких биоактивных растительных пептидов, использованный для открытия регуляторного пептида CEP1 [38].

Протопласты риса использовали для оценки биологической активности пептида PSK с применением метода агаровых блоков. Свежевыделенные протопласты суспендировали в полужидкой, застывающей питательной среде с агарозой при температуре около 40°C. После затвердевания среды вырезали агарозные блоки, содержащие протопласты, которые затем инкубировали в жидкой питательной среде, как с добавлением исследуемого пептида, так и без него (контроль). Критерием биологической активности пептидов служит интенсивность клеточного деления протопластов и образование каллусных агрегатов. Оценка цитокинетической активности пептидов проводится по числу каллусных агрегатов в агаровых блоках [53].

В суспензионной культуре клеток бархатцев был обнаружен 12-аминокислотный пептид TDIF, негативный регулятор клеточной дифференцировки сосудистой системы покрытосеменных растений [14]. Данный пептид оказался членом большого пептидного семейства CLE, обнаруженного у *Arabidopsis*. Интересно, что аминокислотная последовательность додекапептида TDIF из бархатцев (HEVPSGPNPISN, табл. 1) идентична последовательности пептида CLE41/44 из *Arabidopsis*.

3.3. Стрессовые тесты

Изучение клеточного протонного градиента как базового процесса физиологии растений привело к созданию клеточной тест-системы на основе суспензионной культуры клеток *Nicotiana tabacum*. Данная система (alkalinization test) основана на быстром повышении pH жидкой культуральной среды (до 1 ед. за 10 мин), под действием различных стрессовых факторов. Успешная апробация суспензионной культуры клеток томата в ответ на добавление синтетического октадекапептида системына томата привела авторов данного исследования к идее о поиске сигнальных пептидов в суспензионной культуре клеток табака с помощью теста на защелачивание среды как стрессового сигнального фактора, который вырабатывается непосредственно клетками табака как основы самой модельной тест-системы [54].

В процессе поиска факторов, влияющих на изменение pH в культуре клеток табака, был обнаружен октадекопептид HupSys [11] (см. табл. 1). С использованием той же клеточной модельной системы в листьях табака был обнаружен пептид RALF (Rapid Alkalinization Factor) с молекулярной массой 5 кДа [12] (табл. 1).

Дальнейшие поиск и идентификация защитных пептидов с использованием теста, основанного на

измерении защелачивания среды в суспензионной культуре клеток табака, помогли пионерам открытия системина и их ученикам выделить и охарактеризовать защитный пептид AtPep1 из листовых экстрактов *Arabidopsis* (23 аминокислоты; см. табл. 1). Пептид AtPep1 проявлял активность в наномолярном диапазоне концентраций и вызывал усиление продукции перекиси водорода и экспрессию дефензинов [13]. Это исследование показало, что суспензионная культура клеток табака может служить универсальной модельной системой, основанной на защелачивании среды, для поиска и идентификации защитных пептидов растений из различных ботанических семейств.

Обработка растений *Arabidopsis* и кукурузы водными растворами пептидов Пер в низких концентрациях показала, что их можно использовать как средства, усиливающие системные защитные реакции у сельскохозяйственных культур [25, 26].

4. МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ – БАЗОВЫЙ ИНСТРУМЕНТ ПОИСКА И ИДЕНТИФИКАЦИИ ПЕПТИДОВ

При идентификации первых регуляторных пептидов растений системина [8], PSK [9], PSY1 [10], HypSys [11], RALF [12], AtPep1 [13] пептидные фракции, выделенные и очищенные с помощью ВЭЖХ, анализировались с использованием метода деградации Эдмана и масс-спектрометрии для определения их аминокислотной последовательности и идентификации отдельных пептидов.

Применение тандемной масс-спектрометрии явилось значительной вехой на пути поиска и идентификации регуляторных пептидов растений, что видно из серии работ по открытию пептидов семейства CLE в растениях *Arabidopsis*. Результатом многолетних исследований мутантных линий *Arabidopsis thaliana*, несущих мутации в генах CLV1 и CLV3, стало установление молекулярной природы одного из ключевых регуляторов меристематической активности – пептида CLV3. С использованием метода MALDI-TOF-MS/MS было показано, что ранее считавшийся небольшим белком CLV3 представляет собой короткий пептид, состоящий из 12 аминокислот [33–36]. После публикации этого исследования [36], одновременно с работой по определению структуры другого додекапептида семейства CLE – TDIF методом LC-MS/MS [14] в 2006 г., масс-спектро-

метрия стала основным инструментом для идентификации эндогенных пептидов растений. С этого момента она практически вытеснила метод Эдмана, ранее широко применявшийся для анализа пептидов, выделенных из растительного материала (см. табл. 1) [8–13].

Высокопроизводительная тандемная масс-спектрометрия, совмещенная с наножидкостной хроматографией (Q-TOF-LC-MS/MS), открыла возможность идентифицировать сотни различных эндогенных пептидов в экстрактах из растения и получить пептидом на различных этапах развития модельного мха *Physcomitrella patens* [40]. В настоящее время высокопроизводительные масс-спектрометры применяются не только для анализа отдельных пептидов, представляющих специальный интерес, но и для идентификации пептидов, входящих в состав многокомпонентных ансамблей, присутствующих в клетках и тканях растений [41, 44]. Высокопроизводительная масс-спектрометрия дала мощный импульс развитию пептидомики – направлению биоорганической химии, изучающего эндогенные пептиды в клетках, тканях и органах растений и животных [44]. Пептидомика охватывает этапы выделения, очистки, идентификации и характеристики пептидов с целью их качественного, количественного и системного анализа. Несмотря на достигнутый прогресс, функциональные свойства большинства как идентифицированных, так и предполагаемых пептидов до сих пор остаются нераскрытыми. Разработка высокопроизводительных подходов к скринингу биоактивности пептидов должна существенно упростить поиск и идентификацию регуляторных пептидов растений, а также позволит оценить их потенциал для практического применения в растениеводстве.

5. СТРАТЕГИИ ПОИСКА И ИДЕНТИФИКАЦИИ НОВЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ РАСТЕНИЙ

Регуляторные пептиды растений, как правило, состоят из 5–20 аминокислот, но в некоторых случаях могут включать до 50 аминокислот. В целом, пептиды, регулирующие ростовые и защитные процессы в растениях, подразделяются на две основные группы: секретируемые и не-секретируемые [55].

Секретируемые пептиды, такие как PSK [9], CLV3 [36], CLE41/44 и TDIF [14], HypSys [11],

PSY1 [10], CEP [38], RGF/CLEL/GLV [49–51], а также RALF [12], характеризуются наличием сигнальной последовательности на *N*-конце. Несеكريруемые пептиды, такие как системин и AtPep1, не содержат сигнальную последовательность в своем предшественнике [8, 13, 55].

Секретируемые пептиды, содержащие несколько остатков цистеина, например RALF, относятся к так называемым цистеин-содержащим пептидам [12]. Цистеиновые остатки участвуют в образовании внутримолекулярных дисульфидных связей, которые играют решающую роль в обеспечении функциональной активности этих пептидов [12].

За последние 25 лет были разработаны четыре основные стратегии поиска и идентификации новых регуляторных пептидов растений (рис. 1) [2, 55]: (1) очистка пептидов из растительных экстрактов под контролем биотестов; (2) классическая генетика, направленная поиск рецепторов и пептидных лигандов по мутантным фенотипам; (3) биоинформатический поиск гомологов и ортологов установленных регуляторных пептидов; (4) *in silico* скрининг потенциальных белков-предшественников пептидов.

Метод очистки под контролем биотестов сочетает в себе экстракцию пептидов из клеток и тканей растений с последующим биотестированием их биологической активности [55]. Первые регуляторные пептиды растений, включая системин [8], PSK [9], PSY1 [10], HypSys [11], RALF [12] и TDIF [14], были открыты именно с помощью данного подхода (см. табл. 1 и рис. 2). Стратегия очистки пептидов под контролем биотестов не только позволяет эффективно выявлять биологически активные соединения, но и служит основой для функциональной валидации пептидов на ранних этапах исследования.

Классические генетические исследования активности апикальной меристемы побегов у *Arabidopsis* [33, 35] и процессов опадания цветочных органов [56] привели к открытию белковых лигандов CLV3 и IDA, а также их рецепторов CLV1 [57] и HAESA [56, 58], участвующих в регуляции развития растений. Геномный поиск гомологов CLV3 позволил выявить большое семейство генов, обладающих гомологией с CLV3 и содержащих консервативный мотив на *C*-конце – семейство CLE (CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION-related) (рис. 1) [33, 35]. Последо-

вательность аминокислот зрелого пептида CLV3 была установлена методом MALDI-TOF-MS/MS и подтверждена тестами на биоактивность на побегах и корнях *Arabidopsis* [36].

В настоящее время исследования по регуляторным пептидам растений в основном сосредоточены на изучении предполагаемых (putative) пептидов, предсказанных на основе известных последовательностей пептидов, которые были идентифицированы масс-спектрометрически и охарактеризованы при помощи биотестов в прошлые годы.

Биоинформатический поиск предполагаемых (putative) пептидов, основанный на использовании известных биоактивных пептидов в качестве исходных последовательностей, – основной и широко применяемый метод обнаружения новых регуляторных пептидов у растений [55]. Ортологи таких хорошо охарактеризованных пептидов, как системин [19, 59], PSK [60, 61], PSY [62], AtPep1 [29, 63], и CLV3 [36], были выявлены путем выравнивания геномных последовательностей их белков-предшественников в различных таксономических группах растений.

Установлено, что белки-предшественники многих регуляторных пептидов кодируются несколькими генами и имеют длину порядка 70–120 аминокислот. При этом их последовательности внутри одного семейства могут значительно различаться, за исключением консервативного домена, расположенного, как правило, на *C*-конце, который соответствует функциональной пептидной части [38, 55].

Согласно общепринятым допущениям, сделанным в отношении многих семейств пептидов, предполагается, что аминокислотная последовательность регуляторных пептидов соответствует уже идентифицированным с помощью масс-спектрометрии пептидам как по составу, так и по числу аминокислотных остатков. Например, когда системин томата был охарактеризован как пептид из 18 аминокислот, это послужило основанием для предположения, что его гомологи у других пасленовых – таких как картофель и перец – также представляют собой октодекапептиды [64, 65]. Однако их точные аминокислотные последовательности до сих пор не подтверждены.

Аналогичным образом, после установления структуры пептида CLV3 как додекапептида

(12 аминокислот) [36], был синтезирован набор из 25 предполагаемых CLE-пептидов, соответствующих консервативному мотиву CLE у *Arabidopsis* [14]. Все эти синтетические додекапептиды были протестированы на биологическую активность в модельных *in vitro* системах [14, 33]. Примечательно, что пептиды TDIF и CLE44 из семейства CLE также были идентифицированы как додекапептиды с помощью масс-спектрометрии [38]. В то же время более позднее масс-спектрометрическое исследование выявило в тканях *Arabidopsis* 13-аминокислотный вариант пептида CLV3 [66].

Биотестирование предполагаемых синтетических пептидов может дать неожиданные результаты в плане их клеточной активности. Как показало исследование действия 25 предполагаемых (на момент публикации) и двух идентифицированных синтетических CLE- додекапептидов CLV3 и TDIF на рост корней *Arabidopsis*, и на дифференциацию трахеальных элементов в культуре клеток бархатцев, гомологи внутри одного пептидного семейства могут иметь фундаментально различную клеточную активность [48]. В результате CLE-пептиды были разделены на две группы по их биологической активности. Пептиды из группы А активны как регуляторы роста, но не активны в отношении дифференцировки клеток. CLE-пептиды В-типа, не влияют на рост корней *Arabidopsis*, но активны как регуляторы клеточной дифференцировки в ксилотенной культуре клеток бархатцев [14, 48, 67]. В приведенном исследовании разные биотесты выявили два типа пептидов, фундаментально различающихся по своей биологической активности (рост и дифференцировка) внутри одного и того же семейства предполагаемых CLE-пептидов *Arabidopsis*. Таким образом, данная серия работ по CLE-пептидам демонстрирует, что принадлежность пептидов к одному семейству может служить ориентиром для функциональных прогнозов, однако сама по себе не означает и не гарантирует наличие у них той же биологической активности, которая была установлена для первого представителя данного пептидного семейства, охарактеризованного с использованием масс-спектрометрии. Как и в первых работах выделения, очистки и идентификации пептидов, биотесты продолжают играть решающую роль в установлении функциональной

роли пептидов, предсказанных методами биоинформатики.

Следует подчеркнуть, что аминокислотные последовательности ряда ключевых предполагаемых регуляторных пептидов *Arabidopsis*, таких как IDA и CLE40, до настоящего времени не подтверждены с использованием масс-спектрометрического анализа в клетках и тканях данного растения. Тем не менее с использованием искусственной экспрессионной системы на основе листьев *Nicotiana benthamiana* была экспериментально продемонстрирована возможность образования зрелых (коротких) пептидов IDA и CLE40 *Arabidopsis* в результате протеолитического расщепления соответствующих белков-предшественников. Пептиды IDA (14 аминокислот) [68, 69] и CLE40 (12 аминокислот) [70] были идентифицированы методом масс-спектрометрии после транзиторной коэкспрессии белков-предшественников и субтилизинных протеаз (SBT) в листьях *Nicotiana benthamiana*. Обнаружение зрелых (коротких) форм CLE40 и IDA непосредственно в экстрактах *Arabidopsis*, а также других функционально значимых предполагаемых пептидов, остается актуальной задачей, решение которой, вероятно, требует разработки усовершенствованных методов выделения, очистки и масс-спектрометрического анализа пептидов.

Стратегия поиска новых предполагаемых регуляторных пептидов растений была разработана эмпирическим путем на основе *in silico* скрининга генов, кодирующих небольшие белки (70–110 аминокислот) с консервативным доменом в С-концевой области (см. табл. 1, рис. 2) [38, 55]. Такой подход оказался продуктивным и позволил выявить предполагаемое семейство пептидов CER, кодируемое пятью малыми генами *Arabidopsis*, имеющими сходство по консервативному 17-аминокислотному домену в С-концевом регионе [38]. Масс-спектрометрический анализ пептидной фракции из жидкой культуральной среды, в которой выращивались целиком погруженные растения *Arabidopsis*, привел к идентификации 15-аминокислотного пептида CER1 из консервативного домена [38]. Биологические тесты с синтетическим пептидом CER1 и фенотипы при его сверхэкспрессии продемонстрировали его активность как регулятора роста корней [38].

Стратегия *in silico* скрининга регуляторных пептидов была успешно использована для поиска и

идентификации пептидного регулятора дифференциации эндодермы CIF. Анатомическое изучение фенотипа мутантов GSO1/SGN3 *Arabidopsis* показало, что формирование поясков Каспари находится под контролем рецепторной киназы GASSHO1/SCHENGEN3 (GSO1/SGN3) [71–73]. На основании принадлежности GSO1/SGN3 к XI подклассу рецепторных киназ RLL-RK, среди лигандов которых нередко встречаются пептиды, была выдвинута гипотеза об участии в морфогенезе эндодермы неизвестного короткого пептида [74]. В процессе *in silico* скрининга были установлены два близкородственных ортологичных гена *At2g16385* and *At4g34600*, каждый из которых кодирует небольшие белки, состоящие примерно из 80 аминокислотных остатков, и содержит в области С-конца консервативный домен [74]. Филогенетический анализ показал наличие ортологов данных генов среди широкого круга семейств семенных растений. Авторы получили растения *Arabidopsis*, сверхэкспрессирующие *At2g16385*. В фенольных экстрактах из жидкой культуральной среды B5, в которой были выращены целые растения, с помощью высокопроизводительной масс-спектрометрии Orbitrap nano-LC-MS/MS был идентифицирован 21-аминокислотный пептид, сульфатированный по тирозину, которому дали название CIF [74] (табл. 1). Таким образом, открытие пептида CIF как низкомолекулярного регулятора морфогенеза корня с применением стратегии *in silico* скрининга, стало финалом многолетних генетических исследований механизмов формирования эндодермы.

6. ПОИСК РЕЦЕПТОРОВ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ

Молекулярные механизмы действия регуляторных пептидов растений основаны на их роли в качестве лигандов мембранных рецепторов. Основная группа рецепторов растительных пептидов – рецептор-подобные киназы (RLKs), состоящие из внутриклеточного киназного домена, трансмембранного домена и внеклеточного домена. По структуре доменов RLKs растений схожи с рецепторными тирозин-киназами (RTKs) животных, но имеют несколько ключевых отличий [75, 76]. RLKs, взаимодействующие с пептидными лигандами, часто содержат внеклеточные домены, обогащенные лейцином (LRR-домены), которые участвуют в связывании пептидов. RTKs живот-

ных обладают более разнообразными внеклеточными доменами, зависящими от конкретного типа рецептора. Большинство растительных RLKs обладают серин/треонин-киназной активностью, тогда как RTKs животных – тирозин-киназой. Различия в киназных доменах связаны с активацией различных сигнальных путей пептидными рецепторами животных и растений. У *Arabidopsis* обнаружено около 600 RLKs [77], многие из которых могут быть потенциальными рецепторами коротких регуляторных пептидов.

Лиганд-рецепторная пара может быть установлена в генетических исследованиях, основанных на изучении растений, которые несут мутации в разных генах и в то же время имеют общий фенотип (рис. 1). Пример такой серии генетических работ – изучение мутантов *CLV1*, *CLV2* и *CLV3* [33, 35]. После установления рецепторной природы *CLV1*, колокализации транскриптов *CLV1* и *CLV3*, проведенной методом *in situ* гибридизации в апикальной меристеме, и идентификации *CLV3* как додекапептида с использованием MALDI-TOF-MS/MS было продемонстрировано связывание *CLV3* с рецептором *CLV1* [14]. Для этого был синтезирован додекапептид *CLV3*, меченный радиоактивным изотопом йода и содержащий азидосалициловую кислоту в качестве фотоактивируемого линкера, который обеспечивал ковалентное связывание пептида с рецептором в микросомальном препарате из трансгенных клеток табака BY-2. Рецептор *CLV1* из арабидопсиса в этих клетках имел замененный киназный домен на HaloTag (*CLV1*-ΔKD-НТ) для флуоресцентной визуализации белка. Связывание меченного йодом-125 додекапептида *CLV3* с внеклеточным доменом рецепторной киназы *CLV1* было продемонстрировано автордиографией после электрофореза в геле [57].

Часто предполагается, что после установления рецептора для одного пептида, все остальные члены пептидного семейства также взаимодействуют с данным рецептором или с родственными рецепторами как лиганды, выполняя различные функции, что может подтверждаться тестированием предполагаемых пептидных лигандов *in vivo*. Принято также считать, что после установления пептидной лиганд-рецепторной пары у одного вида растений подобные взаимодействия могут выполняются для ортологов лиганда и рецептора в других систематических группах растений. Во многих слу-

чаях это подтверждается молекулярно-генетическими экспериментами. Однако на примере пептидного семейства CLE обнаружено, что разные его представители, а именно додекапептиды CLV3 и CLE41/44 взаимодействуют с разными рецепторами, а именно с CLV1 [57] и PXY [78] соответственно, и по типу биологической активности относятся к разным подгруппам CLE пептидов – А и В соответственно.

Молекулярно-генетические эксперименты, проведенные около 20 лет назад, показали, что функциональная активность предполагаемых пептидов IDA и CLE40 реализуется через их таргетное взаимодействие с рецепторными киназами HAESA и HAESA-LIKE [58] и ACR4 [79] соответственно. Однако, несмотря на эти данные, пептиды IDA и CLE40 по-прежнему рассматриваются как предполагаемые (putative) лиганды рецепторных киназ HAESA, HAESA-LIKE и ACR4, поскольку их прямое связывание с рецепторами остается неподтвержденным на биохимическом уровне. Очень низкое содержание регуляторных пептидов в клетках и тканях растений [6, 44] представляет собой серьезное техническое препятствие для их масс-спектрометрической идентификации. Это особенно актуально для пептидов IDA и CLE40, поскольку их идентификация методом масс-спектрометрии – необходимое обоснование и предварительный этап перед твердофазным синтезом пептидов и радиолигандным подтверждением их взаимодействия с соответствующими рецепторами. Совершенствование методов выделения, очистки и масс-спектрометрического анализа растительных пептидов, по-видимому, откроет путь к идентификации многих предполагаемых пептидов и подтверждению их функциональной активности как лигандов рецепторов с использованием фотоаффинного и радиолигандного анализа.

Идентификация рецепторов – конечная цель изучения механизмов действия новых растительных пептидов. Однако данная цель остается не достигнутой во многих исследованиях идентифицированных функциональных пептидов. Это можно объяснить тем, что поиск рецепторов пептидов у растений представляет собой сложную и трудоемкую задачу [80]. На сегодняшний день рецепторы были выявлены лишь для нескольких десятков установленных пептидов, включая системин томата [81, 82], PSK [83], CLV3 [57],

TDIF/CLE41/44 [78], CLE9, CLE10, CLE11, CLE12 [84], RGF1 [85], RALF [86], AtPep1 [87], PSY [10, 88], CEP1 [89] и CIF [74] (табл. 1). Для идентификации рецепторов функциональных пептидов с известной аминокислотной последовательностью используют фотоаффинный и радиолигандный методы [57]. Данный подход был дополнен созданием библиотек экспрессии рецепторов в клетках табака BY-2, культивируемых *in vitro* и сверхэкспрессирующих 100 целенаправленно выбранных LRR-RLK из *Arabidopsis*, что позволило осуществить идентификацию рецепторов регуляторных пептидов CEP, RGF и CIF [49, 74, 89] (см. табл. 1).

7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Растительные пептиды привлекают внимание исследователей как экологически безопасные биостимуляторы, способные усиливать рост и защиту растений благодаря высокой биологической активности при очень низких концентрациях. За последние десятилетия были обнаружены десятки коротких пептидов, играющих ключевую роль в регуляции роста, развития, защитных реакций и устойчивости к стрессу. Однако существующие стратегии выявления новых пептидных регуляторов пока дают ограниченные результаты, что связано со сложностью и многоэтапностью лабораторных исследований, основанных на молекулярно-генетических методах. Несмотря на то, что исследование многих растительных пептидов не доходит до стадии идентификации их рецепторов и сигнальных путей, проведение биологических тестов с синтетическими пептидами – актуальная задача не только для изучения их функциональной роли, но и для разработки путей к их практическому применению в растениеводстве.

С помощью биоинформатических подходов было предсказано уже несколько сотен потенциальных регуляторных пептидов, исходя из аминокислотных последовательностей установленных регуляторных пептидов в качестве исходных данных для поиска в геномных и транскриптомных базах данных. Несмотря на активное биоинформатическое прогнозирование, присутствие большинства предполагаемых пептидов в клетках и тканях растений до сих пор не подтверждено методами масс-спектрометрического анализа. Тем не менее валидация биологической

активности синтетических пептидов в модельных экспериментах – один из широко практикуемых подходов к изучению не только идентифицированных, но и предполагаемых, неподтвержденных пептидов. Считается, что предполагаемые пептиды, хотя их присутствие в тканях и не подтверждено, выполняют регуляторные функции, аналогичные роли их установленных гомологов и ортологов. Гипотетические функции предполагаемых, неподтвержденных растительных пептидов для многих исследователей служат рациональной основой для дальнейшего изучения их потенциальных белков-предшественников с использованием генетических технологий. Изучение предполагаемых синтетических пептидов системы и StPep1 в вегетационных экспериментах показало их защитный эффект в отношении вирусных и грибных патогенов картофеля (неопубликованные данные).

Генетические технологии, несмотря на их значимость, не позволяют охватить и охарактеризовать сотни и тысячи коротких пептидов растений, предсказанных методами генетической биоинформатики или выявленных с помощью масс-спектрометрического анализа эндогенных пептидов. Полноценная функциональная валидация обширных библиотек растительных пептидов может быть проведена на основе высокопроизводительного скрининга синтетических пептидов по физико-химическим характеристикам и биологической активности. Первичный биофункциональный отбор синтетических пептидов на основе скрининга может быть использован как стартовый этап на пути к полевым испытаниям, необходимым для создания эффективных и экологически безопасных пептидных агротехнологий.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Р.Х. Зиганшину за консультации по использованию масс-спектрометрии и биоинформатики в работах по поиску новых функционально активных пептидов.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-74-30003).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов. Информированное согласие не требовалось.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация – АЮС, МЭТ, НОК; написание статьи – АЮС, ЕЕВ; администрирование проекта – МЭТ, НОК.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tavormina P., De Coninck B., Nikonorova N., De Smet I., Cammue B.P.A.* // *Plant Cell*. 2015. V. 27. P. 2095–2118.
<https://doi.org/10.1105/tpc.15.00440>
2. *Matsubayashi Y.* // *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.* 2018. V. 94. P. 59–74.
<https://doi.org/10.2183/pjab.94.006>
3. *Hellinger R., Sigurdsson A., Wu W., Romanova E.V., Li L., Sweedler J.V., Süßmuth R.D., Gruber C.W.* // *Nat. Rev. Methods Prim.* 2023. V. 3. P. 1–21.
<https://doi.org/10.1038/s43586-023-00205-2>
4. *Yan C.-L., Guan K.-X., Lin H., Feng T., Meng J.-G.* // *Front. Plant Sci.* 2025. V. 16. P. 1506617.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1506617>
5. *Zhang Y.-M., Ye D.-X., Liu Y., Zhang X.-Y., Zhou Y.-L., Zhang L., Yang X.-L.* // *Adv. Agrochem.* 2023. V. 2. P. 58–78.
<https://doi.org/10.1016/j.aac.2023.01.003>
6. *Zhang Z., Han H., Zhao J., Liu Z., Deng L., Wu L., Niu J., Guo Y., Wang, G., Gou, X., Li C., Li C., Li C.-M.* // *Mol. Hort.* 2025. V. 5. P. 7.
<https://doi.org/10.1186/s43897-024-00134-y>
7. *Ruiz C., Nadal A., Montesinos E., Pla M.* // *Mol. Plant Pathol.* 2018. V. 19. P. 418–431.
<https://doi.org/10.1111/mpp.12534>
8. *Pearce G., Strydom D., Johnson S., Ryan C.A.* // *Science*. 1991. V. 253. P. 895–897.
<https://doi.org/10.1126/science.253.5022.895>
9. *Matsubayashi Y., Sakagami Y.* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996. V. 93. P. 7623–7627.
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.15.7623>
10. *Amano Y., Tsubouchi H., Shinohara H., Ogawa M., Matsubayashi Y.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. P. 18333–18338.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0706403104>
11. *Pearce G., Moura D.S., Stratmann J., Ryan C.A.* // *Nature*. 2001. V. 411. P. 817–820.
<https://doi.org/10.1038/35081107>

12. Pearce G., Moura D.S., Stratmann J., Ryan C.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 12843–12847.
<https://doi.org/10.1073/pnas.201416998>
13. Huffaker A., Pearce G., Ryan C.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 10098–10103.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0603727103>
14. Ito Y., Nakanomyo I., Motose H., Iwamoto K., Sawa S., Dohmae N., Fukuda H. // Science. 2006. V. 313. P. 842–845.
<https://doi.org/10.1126/science.1128436>
15. Stührwoldt N., Bühler E., Sauter M., Schaller A. // J. Exp. Bot. 2021. V. 72. P. 3427–3440.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erab017>
16. Tost A.S., Kristensen A., Olsen L.I., Axelsen K.B., Fuglsang A.T. // Genes (Basel). 2021. V. 12. P. 218.
<https://doi.org/10.3390/genes12020218>
17. Ryan C.A., Pearce G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 14577–14580.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1934788100>
18. Pastor V., Sánchez-Bel P., Gamir J., Pozo M.J., Flors V. // Plant Methods. 2018. V. 14. P. 33.
<https://doi.org/10.1186/s13007-018-0301-z>
19. Coppola M., Di Lelio I., Romanelli A., Gualtieri L., Molisso D., Ruocco M., Avitabile C., Natale R., Cascione P., Guerrieri E., Pennacchio F., Rao R. // Plants (Basel). 2019. V. 8. P. 395.
<https://doi.org/10.3390/plants8100395>
20. Zhang H., Zhang H., Lin J. // New Phytol. 2020. V. 226. P. 1573–1582.
<https://doi.org/10.1111/nph.16495>
21. Cirillo V., Molisso D., Aprile A.M., Maggio A., Rao R. // Environ. Exp. Bot. 2022. V. 199. P. 104865.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.104865>
22. Yan J., Xin P., Cheng S., Chu J. // Plant Commun. 2023. V. 4. P. 100638.
<https://doi.org/10.1016/j.xplc.2023.100638>
23. Wang L., Einig E., Almeida-Trapp M., Albert M., Fliegmann J., Mithöfer A., Kalbacher H., Felix G. // Nat. Plants. 2018. V. 4. P. 152–156.
<https://doi.org/10.1038/s41477-018-0106-0>
24. Chen Y.L., Fan K.T., Hung S.C., Chen Y.R. // New Phytol. 2020. V. 225. P. 2267–2282.2020.
<https://doi.org/10.1111/nph.16241>
25. Huffaker A., Ryan C.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 10732–10736.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0703343104>
26. Huffaker A., Pearce G., Veyrat N., Erb M., Turlings T.C.J., Sartor R., Shen Z., Briggs S.P., Vaughan M.M., Alborn H.T., Teal P.E.A., Schmelz E.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. P. 5707–5712.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1214668110>
27. Bartels S., Lori M., Mbengue M., van Verk M., Klausner D., Hander T., Böni R., Robatzek S., Boller T. // J. Exp. Bot. 2013. V. 64. P. 5309–5321.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ert330>
28. Ruiz C., Nadal A., Foix L., Montesinos L., Montesinos E., Pla M. // BMC Genet. 2018. V. 19. P. 11.
<https://doi.org/10.1186/s12863-017-0593-4>
29. Lee M.W., Huffaker A., Crippen D., Robbins R.T., Goggin F.L. // Mol. Plant Pathol. 2017. V. 19. P. 858–869.
<https://doi.org/10.1111/mpp.12570>
30. Zelman A.K., Berkowitz G.A. // Plants. 2023. V. 12. P. 2856.
<https://doi.org/10.3390/plants12152856>
31. Pearce G., Yamaguchi Y., Munske G., Ryan C.A. // Peptides. 2010. V. 31. P. 1973–1977.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.08.012>
32. Abarca A., Franck C.M., Zipfel C. // Plant Physiol. 2021. V. 187. P. 996–1010.
<https://doi.org/10.1093/plphys/kiab308>
33. Fletcher J.C., Brand U., Running M.P., Simon R., Meyerowitz E.M. // Science. 1999. V. 283. P. 1911–1914.
<https://doi.org/10.1126/science.283.5409.1911>
34. Fletcher J.C. // Trends Plant Sci. 2020. V. 25. P. 1005–1016.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.04.014>
35. Cock J.M., McCormick S. // Plant Physiol. 2001. V. 126. P. 939–942.
<https://doi.org/10.1104/pp.126.3.939>
36. Kondo T., Sawa S., Kinoshita A., Mizuno S., Kaki moto T., Fukuda H., Sakagami Y. // Science. 2006. V. 313. P. 845–848.
<https://doi.org/10.1126/science.1128439>
37. Hagelthorn L., Fletcher J.C. // Front. Plant Sci. 2023. V. 14.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1240342>
38. Ohyama K., Ogawa M., Matsubayashi Y. // Plant J. 2008. V. 55. P. 152–160.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2008.03464.x>
39. Roy S., Griffiths M., Torres-Jerez I., Sanchez B., Antonelli E., Jain D., Krom N., Zhang S., York L.M., Scheible W.-R., Udvardi M. // Front. Plant Sci. 2022. V. 12. P. 793145.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.793145>
40. Skripnikov A.Y., Anikanov N.A., Kazakov V.S., Dolgov S.V., Ziganshin R.K., Govorun V.M., Ivanov V.T. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2011. V. 37. P. 108–118.
<https://doi.org/10.1134/s1068162011010158>
41. Fesenko I.A., Arapidi G.P., Skripnikov A.Y., Alexeev D.G., Kostryukova E.S., Manolov A.I., Altukhov I.A., Khazigaleeva R.A., Seredina A.V., Kovalchuk S.I., Ziganshin R.H., Zgoda V.G., Novikova S.E., Semashko T.A., Slizhikova D.K., Ptushenko V.V., Gorbachev A.Y., Govorun V.M., Ivanov V.T. // BMC Plant Biol. 2015. V. 15. P. 87.
<https://doi.org/10.1186/s12870-015-0468-7>

42. Tian D., Xie Q., Deng Z., Xue J., Li W., Zhang Z., Dai Y., Zheng B., Lu T., De Smet I., Guo Y. // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1000297>
43. Boschiero C., Dai X., Lundquist P.K., Roy S., de Bang T.C., Zhang S., Zhuang Z., Torres-Jerez I., Udvardi M.K., Scheible W.-R., Zhao P.X. // *Plant Physiol.* 2020. V. 183. P. 399–413.
<https://doi.org/10.1104/pp.19.01088>
44. Chen Y.-L., Lee C.-Y., Cheng K.-T., Chang W.-H., Huang R.-N., Nam H.G., Chen Y.-R. // *Plant Cell.* 2014. V. 26. P. 4135–4148.
<https://doi.org/10.1105/tpc.114.131185>
45. Mohd-Radzman N.A., Binos S., Truong T.T., Imin N., Mariani M., Djordjevic M.A. // *J. Exp. Bot.* 2015. V. 66. P. 5289–5300.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erv008>
46. Xu W., Ding G., Yokawa K., Baluška F., Li Q.-F., Liu Y., Shi W., Liang J., Zhang J. // *Sci. Rep.* 2013. V. 3. P. 1273.
<https://doi.org/10.1038/srep01273>
47. Xu L., Li S., Shabala S., Jian T., Zhang W. // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. P. 637.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00637>
48. Whitford R., Fernandez A., Groodt R.D., Ortega E., Hilson P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. V. 105. P. 18625–18630.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0809395105>
49. Matsuzaki Y., Ogawa-Ohnishi M., Mori A., Matsubayashi Y. // *Science.* 2010. V. 329. P. 1065–1067.
<https://doi.org/10.1126/science.1191132>
50. Meng L., Buchanan B.B., Feldman L.J., Luan S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012. V. 109. P. 1760–1765.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1119864109>
51. Whitford R., Fernandez A., Tejos R., Pérez A.C., Kline-Vehn J., Vanneste S., Drozdzecki A., Leitner J., Abas L., Aerts M., Hoogewijs K., Baster P., Groodt R.D., Lin Y.-C., Storme V., Van de Peer Y., Beeckman T., Madder A., Devreese B., Luschig C., Friml J., Hilson P. // *Dev. Cell.* 2012. V. 22. P. 678–685.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.02.002>
52. Meng L., Buchanan B.B., Feldman L.J., Luan S. // *Mol. Plant.* 2012. V. 5. P. 955–957.
<https://doi.org/10.1093/mp/sss060>
53. Matsubayashi Y., Takagi L., Sakagami Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. P. 13357–13362.
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.13357>
54. Pearce G., Ryan C.A. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 30044–30050.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M304159200>
55. Matsubayashi Y. // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2014. V. 65. P. 385–413.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120122>
56. Butenko M.A., Patterson S.E., Grini P.E., Stenvik G.-E., Amundsen S.S., Mandal A., Aalen R.B. // *Plant Cell.* 2003. V. 15. P. 2296–2307.
<https://doi.org/10.1105/tpc.014365>
57. Ogawa M., Shinohara H., Sakagami Y., Matsubayashi Y. // *Science.* 2008. V. 319. P. 294.
<https://doi.org/10.1126/science.1150083>
58. Stenvik G.-E., Tandstad N.M., Guo Y., Shi C.-L., Kristiansen W., Holmgren A., Clark S.E., Aalen R.B., Butenko M.A. // *Plant Cell.* 2008. V. 20. P. 1805–1817.
<https://doi.org/10.1105/tpc.108.059139>
59. Bubici G., Carluccio A.V., Stavalone L., Cillo F. // *PLoS One.* 2017. V. 12.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171902>
60. Wu T., Kamiya T., Yumoto H., Sotta N., Katsushi Y., Shigenobu S., Matsubayashi Y., Fujiwara T. // *J. Exp. Bot.* 2015. V. 66. P. 6889–6900.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erv105>
61. Kou X., Liu Q., Sun Y., Wang P., Zhang S., Wu J. // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11. P. 601993.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.601993>
62. Ampomah-Dwamena C., Tomes S., Thrimawithana A.H., Elborough C., Bhargava N., Rebstock R., Sutherland P., Ireland H., Allan A.C., Espley R.V. // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.967143>
63. Zhang L., Gleason C. // *Nat. Plants.* 2020. V. 6. P. 625–629.
<https://doi.org/10.1038/s41477-020-0689-0>
64. Pearce G., Bhattacharya R., Chen Y.-C. // *Plant Signal. Behav.* 2008. V. 3. P. 1091–1092.
<https://doi.org/10.4161/psb.3.12.6907>
65. Constabel C.P., Yip L., Ryan C.A. // *Plant Mol. Biol.* 1998. V. 36. P. 55–62.
<https://doi.org/10.1023/a:1005986004615>
66. Ohyama K., Shinohara H., Ogawa-Ohnishi M., Matsubayashi Y. // *Nat. Chem. Biol.* 2009. V. 5. P. 578–580.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.182>
67. Yamaguchi Y.L., Ishida T., Sawa S. // *J. Exp. Bot.* 2016. V. 67. P. 4813–4826.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erw208>
68. Schardon K., Hohl M., Graff L., Pfannstiel J., Schulze W., Stintzi A., Schaller A. // *Science.* 2016. V. 354. P. 1594–1597.
<https://doi.org/10.1126/science.aai8550>
69. Stührwoldt N., Hohl M., Schardon K., Stintzi A., Schaller A. // *Commun. Integr. Biol.* 2017. V. 11. P. e1395119.
<https://doi.org/10.1080/19420889.2017.1395119>
70. Stührwoldt N., Ehinger A., Thellmann K., Schaller A. // *Plant Physiol.* 2020. V. 184. P. 1573–1584.
<https://doi.org/10.1104/pp.20.00528>
71. Pfister A., Barberon M., Allassimone J., Kalmbach L., Lee Y., Vermeer J.E.M., Yamazaki M., Li G., Maurer C., Takano J., Kamiya T., Salt D.E., Roppolo D., Geldner N. // *Elife.* 2014. V. 3. P. e03115.
<https://doi.org/10.7554/eLife.03115>
72. Allassimone J., Fujita S., Doblas V.G., van Dop M., Barberon M., Kalmbach L., Vermeer J.E.M., Rojas-Murcia N., Santuari L., Hardtke C.S., Geldner N. // *Nat. Plants.* 2016. V. 2. P. 16113.
<https://doi.org/10.1038/nplants.2016.113>

73. Doblas V.G., Smakowska-Luzan E., Fujita S., Alasimone J., Barberon M., Madalinski M., Belkhadir Y., Geldner N. // *Science*. 2017. V. 355. P. 280–284.
<https://doi.org/10.1126/science.aaj1562>
74. Nakayama T., Shinohara H., Tanaka M., Baba K., Ogawa-Ohnishi M., Matsubayashi Y. // *Science*. 2017. V. 355. P. 284–286.
<https://doi.org/10.1126/science.aai9057>
75. Lemmon M.A., Schlessinger J. // *Cell*. 2010. V. 141. P. 1117–1134.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.011>
76. Okuda S. // *Peptides*. 2021. V. 144. P. 170614.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170614>
77. Lease K.A., Walker J.C. // *Plant Physiol.* 2006. V. 142. P. 831–838.
<https://doi.org/10.1104/pp.106.086041>
78. Eitchells J.P., Turner S.R. // *Development*. 2010. V. 137. P. 767–774.
<https://doi.org/10.1242/dev.044941>
79. Stahl Y., Wink R.H., Ingram G.C., Simon R. // *Curr. Biol.* 2009. V. 19. P. 909–914.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.03.060>
80. Olsson V., Joos L., Zhu S., Gevaert K., Butenko M.A., De Smet I. // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2019. V. 70. P. 153–186.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040413>
81. Scheer J., Ryan C.A. // *Plant Cell*. 1999. V. 11. P. 1525–1536.
<https://doi.org/10.1105/tpc.11.8.1525>
82. Meindl T., Boller T., Felix G. // *Plant Cell*. 1998. V. 10. P. 1561–1570.
<https://doi.org/10.1105/tpc.10.9.1561>
83. Matsubayashi Y., Ogawa M., Morita A., Sakagami Y. // *Science*. 2002. V. 296. P. 1470–1472.
<https://doi.org/10.1126/science.1069607>
84. Shinohara H., Moriyama Y., Ohyama K., Matsubayashi Y. // *Plant J.* 2012. V. 70. P. 315–326.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2012.04934.x>
85. Shinohara H., Mori A., Yasue N., Sumida K., Matsubayashi Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016. V. 113. P. 3897–3902.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1522639113>
86. Stegmann M., Monaghan J., Smakowska-Luzan E., Rovenich H., Lehner A., Holton N., Belkhadir Y., Zipfel C. // *Science*. 2017. V. 355. P. 287–289.
<https://doi.org/10.1126/science.aal2541>
87. Yamaguchi Y., Huffaker A., Bryan A.C., Tax F.E., Ryan C.A. // *Plant Cell*. 2010. V. 22. P. 508–522.
<https://doi.org/10.1105/tpc.109.068874>
88. Mosher S., Seybold H., Rodriguez P., Stahl M., Davies K.A., Dayaratne S., Morillo S.A., Wierzbica M., Favory B., Keller H., Tax F.E., Kemmerling B. // *Plant J.* 2013. V. 73. P. 469–482.
<https://doi.org/10.1111/tpj.12050>
89. Tabata R., Sumida K., Yoshii T., Ohyama K., Shinohara H., Matsubayashi Y. // *Science*. 2014. V. 346. P. 343–346.
<https://doi.org/10.1126/science.1257800>
90. Kinoshita A., Nakamura Y., Sasaki E., Kyojuka J., Fukuda H., Sawa S. // *Plant Cell Physiol.* 2007. V. 48. P. 1821–1825.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcm154>

Discovery and Identification of Plant Regulatory Peptides

A. Yu. Skripnikov*, #, E. E. Vorobeva*, M. E. Taliansky**, and N. O. Kalinina**

Phone: +7 (495)-939-12-68; e-mail: depthbioorg@gmail.com

* Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119234 Russia

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

Plant regulatory peptides represent a novel class of signaling molecules that play a central role in the regulation of plant growth, development, and stress responses. Owing to their high biological activity at low concentrations, they are considered promising biostimulants for environmentally sustainable agriculture. This review summarizes key theoretical approaches and experimental methods used for the discovery and identification of these peptides, including mass spectrometry, bioinformatics, bioassays, and *in silico* screening. An overview is provided of the major peptides identified to date – such as systemin, PSK, PSY, AtPep1, CLV3, TDIF, CEP, and CIF – along with the methods used for their isolation, chemical synthesis, and functional validation. Special attention is given to model systems based on cell cultures and seedlings, which are commonly employed to screen peptide activity, as well as to strategies for identifying their corresponding receptors. The review highlights the critical role of bioassays as a final and indispensable stage in peptide discovery pipelines, enabling the functional evaluation of both identified and putative peptides.

Keywords: plant peptides, mass spectrometry; putative peptides; regulatory peptides; root growth assay; signaling peptides