

С. В. Суховеева, Е. М. Кабачевская, академик И. Д. Волотовский

*Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь*

ЗАВИСИМОСТЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ В КЛЕТКАХ ВЕРХУШЕЧНЫХ ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ ТОМАТА ОТ ГРАВИСТИМУЛЯЦИИ И ОБРАБОТКИ ЭТЕФОНОМ

Аннотация. С использованием ОТ-ПЦР в режиме реального времени выявлена чувствительность к гравистимуляции экспрессии на уровне транскрипции трех генов, кодирующих белки, участвующие в сигнальной кальциевой трансдукции. На ранних этапах ответа, начиная с 15–60 мин действия гравистимула для трех генов (*SCA2*, *PBP2*, *CAM2*) показано увеличение образования транскриптов. Обработка растений перед началом гравистимуляции этефоном (источником экзогенного этилена) приводила к изменению характера модуляции экспрессии изученных генов в ответ на гравистимул. Рассматривается роль кальциевого метаболизма в клетке в реализации финальных стадий гравитропического ответа растения.

Ключевые слова: растения томата (*Lycopersicon esculentum* L.), гравитропизм, экспрессия генов, этилен, этефон, ионы кальция, кальций-транспортная АТФаза, кальмодулин, PID-связывающий белок

Для цитирования. Суховеева, С. В. Зависимость экспрессии генов кальциевой сигнальной системы в клетках верхушечных листьев растений томата от гравистимуляции и обработки этефоном / С. В. Суховеева, Е. М. Кабачевская, И. Д. Волотовский // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2021. – Т. 65, № 4. – С. 456–465. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-4-456-465>

Sviatlana V. Sukhaveyeva, Alena M. Kabachevskaya, Academician Igor D. Volotovski

Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

DEPENDENCE OF EXPRESSION OF GENES CONTROLLING CALCIUM SIGNALING ON GRAVISTIMULATION IN CELLS OF TOMATO APICAL LEAVES AND TREATMENT BY ETEPHON

Abstract. The sensitivity of expression at the level of transcription of genes encoding proteins involved in calcium signal transduction to gravistimulation was revealed using real-time RT-PCR. For three genes *SCA2*, *PBP2*, *CAM2*, the increase in the transcript formation was shown at early response stages, starting from 15–60 minute gravistimulus. The treatment of plants before the start of gravistimulation with an ethephon (source of exogenous ethylene) led to a change in the modulation of expression of the studied genes in response to gravistimulus. The role of calcium metabolism in realization of final steps of gravitropism reaction is considered.

Keywords: tomato (*Lycopersicon esculentum* L.), gravitropism, gene expression, ethylene, ethephon, calcium ions, calcium-transporting ATPase, calmodulin, PID-binding protein

For citation. Sukhaveyeva S. V., Kabachevskaya A. M., Volotovski I. D. Dependence of expression of genes controlling calcium signaling on gravistimulation in cells of tomato apical leaves and treatment by ethephon. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2021, vol. 65, no. 4, pp. 456–465 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-4-456-465>

Введение. На протяжении всего своего онтогенеза растение, находясь на Земле, испытывает действие гравитационного поля, которое реализуется благодаря полярности отдельных клеток и целых органов растения. Положение органа в пространстве формируется за счет ростовой реакции на действие гравитации (гравитропизм). Корни растений растут по направлению вектора силы тяжести, демонстрируя положительный гравитропизм, а побеги – против вектора гравитации, проявляя отрицательный гравитропизм. Одним из физиологических проявлений гравитропизма является формирование изгибов осевых органов (корня и побега) растения в ответ на изменение их положения в пространстве.

Установлено, что восприятие гравитационного стимула включает в себя перемещение статолитов в пределах статолита под действием силы тяжести. Такое перемещение статолитов вызывает в клетке изменения, происходящие на биохимическом и молекулярном уровне, которые играют важную роль в трансдукции гравистимула на клеточном и органном уровне и формировании гравитропического изгиба.

Важными участниками процесса формирования гравитропической реакции у растений являются регулятор роста растений фитогормон ауксин (3-индолил-уксусная кислота (ИУК)), а также ионы кальция, играющие ключевую роль во внутриклеточной сигнализации растительной клетки [1; 2].

Ауксин в тканях взрослого растения синтезируется локально в клетках апикальной меристемы и молодых листьев. Его распределение между различными частями растения происходит благодаря направленному от клетки к клетке полярному транспорту, который регулируется трансмембранными белками-переносчиками входящего и исходящего потока ауксина. Полярный транспорт ауксина направлен преимущественно базипетально: от апикальной части стебля, где осуществляется биосинтез ИУК, к корню. Для индуцирования процесса гравитропического изгиба корня или стебля необходимо участие локализованных на цитоплазматической мембране клеток PIN-белков, транспортеров выхода ауксина, благодаря асимметричному распределению которых на разных участках плазмалеммы обеспечивается перенаправление транспорта ауксина от базипетального к радиальному направлению, в результате чего верхняя или нижняя сторона перевернутого корня или стебля, соответственно, накапливает ауксина больше, чем противоположная, в результате усиливается рост растяжением этой стороны и происходит изгиб органа. На примере корней арабидопсиса, с помощью искусственного флуоресцентного ауксинового сенсора DII-Venus, показано, что первичное перераспределение ИУК между верхней и нижней половинами корня происходит в пределах 5 мин после начала гравистимуляции [2]. В течение такого же короткого промежутка времени (5 мин) зарегистрировано первичное увеличение концентрации цитоплазматического Ca^{2+} в клетках эндодермы стебля хризантемы при гравистимуляции растений, который участвует в регуляции различий, инициированных ИУК, между верхней и нижней сторонами стебля [3]. При этом прослеживается корреляция между увеличением концентрации ионов кальция в цитоплазме и изгибом стебля [3]. Изменения уровня содержания ионов кальция в цитоплазме сопровождаются сдвигами функционального состояния кальциевой транспортной и сигнальной систем растений, основными элементами которых являются Ca^{2+} -каналы, Ca^{2+} -АТФазы, Ca^{2+}/H^{+} -обменники, разнообразные Ca^{2+} -связывающие белки. Их роль в формировании ответа при действии гравистимуляции на молекулярно-генетическом уровне детально не исследована. Это обусловлено следующим обстоятельством: вышеприведенные участники кальциевого метаболизма выполняют разные функции, одни из них в ответ на стимул вызывают рост концентрации ионизированного кальция в цитоплазме, а другие, наоборот, минимизируют его содержание, обеспечивая низкое содержание ионизированного иона в цитоплазме растительной клетки.

На рост и развитие растений влияет не только ИУК, но и другие гормональные сигналы. К числу важных регуляторов роста относится стрессовый фитогормон этилен. Роль этилена в росте органов растений подтверждается физиологически с использованием ингибиторов этилена и генетически с использованием нечувствительных к этилену мутантов или трансгенных растений, лишенных ключевых ферментов его биосинтеза. Имеется информация, что этилен улучшает рост листьев арабидопсиса в ответ на неблагоприятные факторы [4]. При этом реакция роста и развития листьев на этилен зависит от его концентрации и вида растения, подвергнутого воздействию. Эффекты, которые оказывает этилен на реакции растения, зачастую носят двойной и противоположный эффект, т. е. могут иметь как стимулирующее, так и ингибирующее влияние на ростовую (или тропическую) реакцию одновременно при любых заданных концентрациях, обнаруживаемых в растительных тканях, и сила двух противоположных эффектов изменяется по отношению друг к другу [5]. Конечное фенотипическое проявление ответа зависит от динамического взаимодействия и баланса двух эффектов в изучаемом растительном органе. В частности, этилен оказывает двойное и противоположное действие на отрицательный грави-

тропизм побегов, т. е. может замедлять или усиливать гравитропический ответ в различных условиях и в различных органах [5].

Большая часть информации, накопленная до настоящего времени относительно механизмов гравитропического ответа, получена для корня или стебля растения. В то же время имеется информация о том, что листья также могут проявлять чувствительность к гравистимуляции. В частности, показано ее наличие у листьев арабидопсиса в темноте, выражающееся в физиологических изменениях [6]. При этом на молекулярно-генетическом уровне реакции листьев растения на гравистимуляцию практически не изучены.

Для изучения воздействия гравистимуляции на листья растений томата были отобраны потенциальные гены-кандидаты белков, участвующих в кальциевом транспорте и сигнализации в клетке: Ca^{2+} -транспортирующая АТФаза *SCA2* (calcium-transporting ATPase2), а также ряд Ca^{2+} -связывающих белков, принимающих участие в сигнальных процессах: кальмодулин 2 (*CAM2*), кальмодулин 3 (*CAM3*), PID-связывающий белок 2 (*PBP2*, PID-binding protein 2).

Для расширения представлений о роли выбранных генов в участии гравитропического ответа растений дополнительным фактором воздействия была выбрана обработка растений этифоном, одним из наиболее часто используемых регуляторов роста растений, биологическое действие которого обусловлено его превращением в клетке в фитогормон этилен, но до сих пор механизмы его регуляторного действия до конца не изучены.

Целью данного исследования явилось изучение относительной экспрессии генов *SCA2*, *PBP2*, *CAM2*, *CAM3* белков кальциевого метаболизма по критерию их транскрипции при гравистимуляции и совместном действии гравистимуляции и донора экзогенного этилена этифона.

Материалы и методы исследования. В качестве объекта исследования использовали молодые верхушечные листья 50-дневных растений томата (*Lycopersicon esculentum* L.) сорта «Л1» отечественной селекции. Растения выращивали при 16-часовом световом дне и освещении полихроматическим белым светом (40 Вт, 150 мкмоль $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$), при температуре 24 °С. Гравистимуляция растений проводилась путем поворота растений на 90° относительно гравитационного вектора Земли. В горизонтальном положении растения выдерживались различные интервалы времени (в пределах от 15 мин до 6 ч). Для исключения побочного эффекта изменения условий освещенности после поворота растений горизонтально и возможного развития дополнительной фототропической реакции на экспрессию изучаемых генов, гравистимуляцию проводили в темноте, при этом перед началом гравистимуляции растения помещались в темноту на 24 ч для их адаптации.

Для оценки возможного влияния экзогенного этилена на развитие гравитропической реакции томаты экспериментальной группы подвергали обработке раствором этифона (Ethephon C0143-100MG Sigma) в концентрации 100 мг/л (по одному разу в день в течение 8 дней). Обработку осуществляли путем контакта (прикосновения) ватного диска, пропитанного раствором этифона, с листовой пластинкой растения в течение 3 с. Для приготовления раствора этифона использовали дистиллированную воду. Свежий раствор этифона готовили перед каждой обработкой. Надземную часть томатов контрольной группы растений по одному разу в сутки обрабатывали аналогичным способом дистиллированной водой с использованием ватных дисков в течение 8 дней. Обработка растений проводилась до гравистимуляции и адаптации к темноте.

Отбор растительной ткани контрольных и экспериментальных растений проводился на неактивном для фоторецепторов растений тусклом зеленом свете (лампа накаливания 15 Вт, стеклянный светофильтр с максимумом пропускания 470–605 нм, 0,45 мкмоль $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$). Фрагменты листовой ткани (общая масса навески – 50–100 мг) погружались в фарфоровые ступки с жидким азотом для быстрой полной остановки внутриклеточных реакций и гомогенизировались фарфоровым пестиком. Из замороженных образцов выделяли общую РНК с использованием реагента TRI-reagent (Sigma, Германия) согласно протоколу производителя. Содержание РНК в полученных препаратах оценивали спектрометрическим методом на спектрофотометре Nanodrop 2000с (Thermo Scientific) бесцветным способом путем измерения поглощения раствора при 260 нм. Качество полученных препаратов тестировалось спектрофотометрически (по показателю A_{260}/A_{280} , которое должно составлять 2,0–2,2 для чистых образцов).

Препараты кДНК получали на матрице общей РНК с использованием случайных гексамерных праймеров и обратной транскриптазы производства Thermo Fisher Scientific Baltics (Литва). На реакцию брали 2 мкг общей РНК, предварительно обработанной ДНКазой (Deoxyribonuclease I), что позволяло избавиться от возможного загрязнения образцов геномной ДНК.

Объем реакционной смеси для амплификации фрагментов кДНК составлял 20 мкл. ПЦР проводили в термоциклере CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Био-Рад, США) с использованием набора Luna® Universal qPCR Master Mix (New England BioLabs Inc., США). Перед началом ПЦР реакционные смеси обрабатывались урацилгликозилазой производства Thermo Fisher Scientific (США) для удаления возможных неспецифических ампликонов. Для оценки экспрессии генов Ca²⁺-АТФазы SCA2, кальмодулина 2 (CAM2), кальмодулина 3 (CAM3), кальций-зависимого PID-связывающего белка 2 (PBP2) в клетках растений томата использовали следующие пары праймеров: SCA2_S2 CGCTTTACCAACTCACTCAG, SCA2_A2 GTGTAAGTGAAGGCTGCAATA; CAM2S1 AGGGAAGCTGATGTTGATGG, CAM2A1 ACTAGACAAGAGCCTACCCAA; CAM3S1 CAGACTTGGTCAGCTTTGGGA, CAM3A1 CAGCCGAGGTACAAGACAAGA; PBP2S1 TGGATGGTGAAGGAGCACTT, PBP2A1 GGGTTGGAAATGAATAAGCCCC.

Расчет и анализ полученных данных проводили с использованием компьютерной программы расчета относительной экспрессии генов REST-MCS (Relative Expression Software Tool, Multiple Condition Solver (ver. 2), разработанной M. W. Pfaffl и соавт. в Германии [7]). Отмечена точность, воспроизводимость данных этой программы и ее пригодность для расчетов межгрупповых и индивидуальных соотношений. При расчетах в качестве гена-нормализатора использовали 18S rRNA (18S rRNAS CGACCCGCGAAGTCTGTTTT, 18S rRNAA GGGAGGGCTGTCGATTGTAGTATT), уровень экспрессии которого считается стабильным в различных условиях и принимаемым за точку отсчета в нормализованных результатах.

Статистически достоверными признавались данные при величине $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Исследовали характер экспрессии генов SCA2, PBP2, CAM2, CAM3 в верхушечных листьях томата при действии гравистимула, этефона, гравистимула и этефона.

В результате проведенных экспериментов показано, что в первые 30 мин после начала гравистимуляции наблюдалось некоторое снижение по сравнению с контролем содержания транскриптов SCA2, кодирующего Ca²⁺-АТФазу плазмалеммы, в клетках верхушечных листьев растений томата. Однако уже через 1 ч уровень экспрессии этого гена заметно увеличивался и достигал

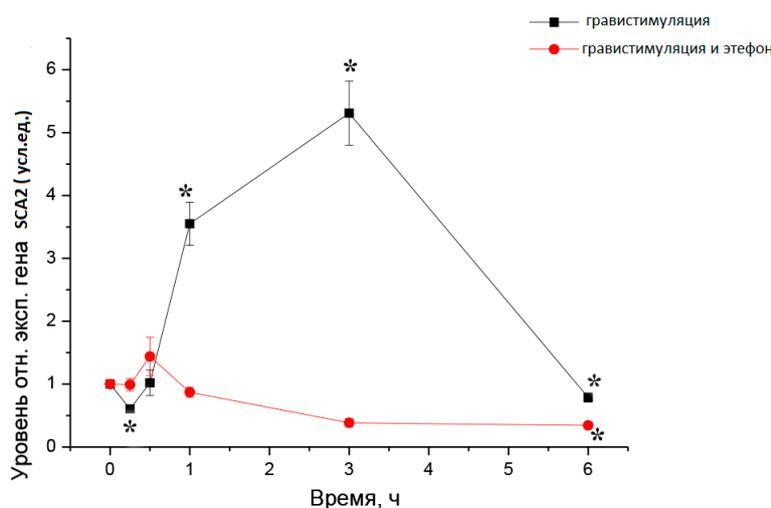


Рис. 1. Изменения уровня относительной экспрессии гена SCA2 в клетках верхушечных листьев томата при действии гравитропического стимула, гравитропического стимула и этефона. * – статистически достоверными признавались данные при величине $p < 0,05$

Fig. 1. Modulation of relative expression of SCA2 gene by gravistimulation, gravistimulation and ethephon treatment in cells of tomato leaves. * – significant differences $p < 0.05$

максимума через 3 ч гравистимуляции (рис. 1). В то же время в период формирования гравитропического ответа после предварительной обработки растений этефоном выявленный всплеск экспрессии *SCA2* отсутствовал; наблюдалось даже снижение уровня накопления транскриптов *SCA2* в период 1–6 ч гравистимуляции (рис. 1).

Количественная оценка уровня накопления транскриптов *CAM2* и *CAM3* при гравистимуляции позволила выявить следующую динамику для обоих исследуемых генов кальмодулина (рис. 2): в первые 30 мин воздействия одиночного гравистимула наблюдалась тенденция к снижению экспрессии *CAM2*, *CAM3* по сравнению с контролем, далее было зарегистрировано увеличение уровня содержания транскриптов, при этом наиболее высокий уровень экспрессии *CAM2* наблюдался через 3 ч воздействия гравистимуляции (рис. 2, *a*), а у *CAM3* – через 6 ч гравитропического воздействия (рис. 2, *b*). При действии гравистимуляции и этефона на ранних этапах ответа (через 1 ч) наблюдалось увеличение (в 2,7 раза по сравнению с контрольной группой) уровня экспрессии *CAM2* (рис. 2, *a*). В тех же условиях уровень экспрессии *CAM3* через 15–30 мин воздействия гравистимула был близок к контролю, а далее увеличивался: через 1 ч в 1,8 раза, а через 3 ч – в 1,2 раза соответственно (рис. 2, *b*).

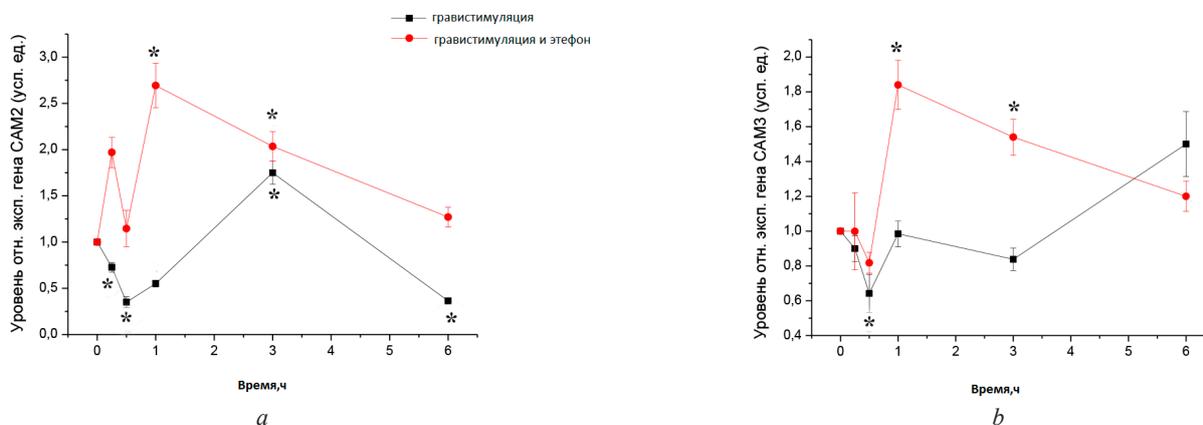


Рис. 2. Изменения уровня относительной экспрессии генов *CAM2* (*a*), *CAM3* (*b*) в клетках верхушечных листьев томата при действии гравитропического стимула, гравитропического стимула и этефона. * – статистически достоверными признавались данные при величине $p < 0,05$

Fig. 2. Modulation of relative expression of *CAM2* (*a*), *CAM3* (*b*) genes by gravistimulation, gravistimulation and ethephon treatment in cells of tomato leaves. * – significant differences $p < 0.05$

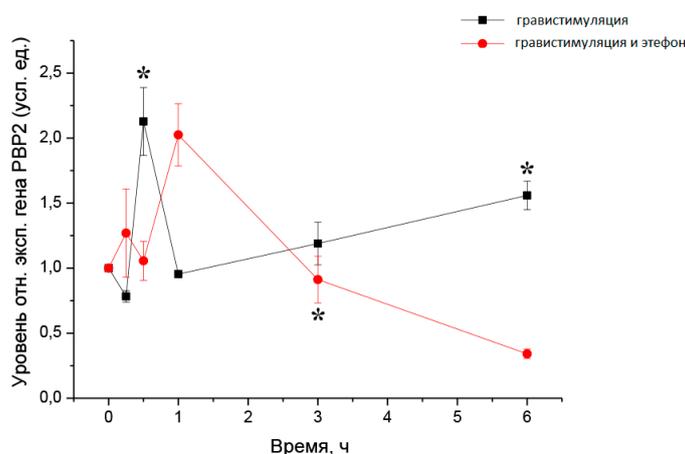


Рис. 3. Изменения уровня относительной экспрессии гена *PBP2* в клетках верхушечных листьев томата при действии гравитропического стимула, гравитропического стимула и этефона. * – статистически достоверными признавались данные при величине $p < 0,05$

Fig. 3. Modulation of relative expression of *PBP2* gene by gravistimulation, gravistimulation and ethephon treatment in cells of tomato leaves. * – significant differences $p < 0.05$

Относительный уровень экспрессии *PBP2* при гравистимуляции увеличивался через 30 мин в 2,1 раза, через 1 и 3 ч уровень накопления транскриптов был близок к контролю, а на 6 ч гравистимуляции был снова увеличен (рис. 3). На фоне предварительной обработки растений этефоном уровень относительной экспрессии *PBP2* в первые 30 мин не изменялся по сравнению с контролем, после чего наблюдалась тенденция к увеличению накопления транскриптов (более чем в 2 раза через 1 ч гравистимуляции); к 3-му часу воздействия экспрессия *PBP2* была близка к норме, после чего наблюдалось снижение уровня экспрессии (на 70 % к 6 ч воздействия) (рис. 3).

Также был проведен анализ влияния этефона на базальный уровень экспрессии исследованных генов в нормальных условиях гравитации (рис. 4). Показано, что уровень накопления транскриптов *SCA2* был увеличен в 2 раза, гена *CAM2* – снижен в 19 раз. Наблюдалась тенденция к снижению экспрессии *PBP2* в 1,5 раза и *CAM3* – в 1,7 раза.

Из литературы известно, что в клетках растений функционирует обширное семейство кальциевых АТФаз. Например, в арабидопсисе описано 11 генов кальций-транспортных АТФаз нескольких типов, участвующих в регуляции многих внутриклеточных процессов [8]. В частности, в корнях арабидопсиса при гравистимуляции показано накопление транскриптов гена *ECA1*, принадлежащего по филогенетическому признаку к подгруппе растительных кальций-транспортных АТФаз ПА типа [8]. В то же время исследуемый нами ген *SCA2* относится к кальций-транспортным АТФазами ПВ типа. Кальций-транспортные АТФазы типа ПА проявляют сходство с кальциевыми насосами в животных клетках, обнаруженными в саркоплазматическом или эндоплазматическом ретикулуме (SERCA). Кальций-транспортные АТФазы типа ПВ проявляют сходство с Ca^{2+} -АТФазами, обнаруженными в плазматической мембране животных клеток [9]. Таким образом, можно сделать вывод о том, что в ответе растений на гравистимуляцию возможно участие как АТФаз ПА, так и ПВ типов. Поскольку главной функцией кальций-транспортных АТФаз является выкачивание избытка ионов кальция из цитоплазмы [9], наблюдаемое в наших экспериментах увеличение уровня экспрессии гена *SCA2* в период 0,5–3 ч после начала воздействия отражает, по всей видимости, процесс активации Ca^{2+} -АТФазы, снижение уровня

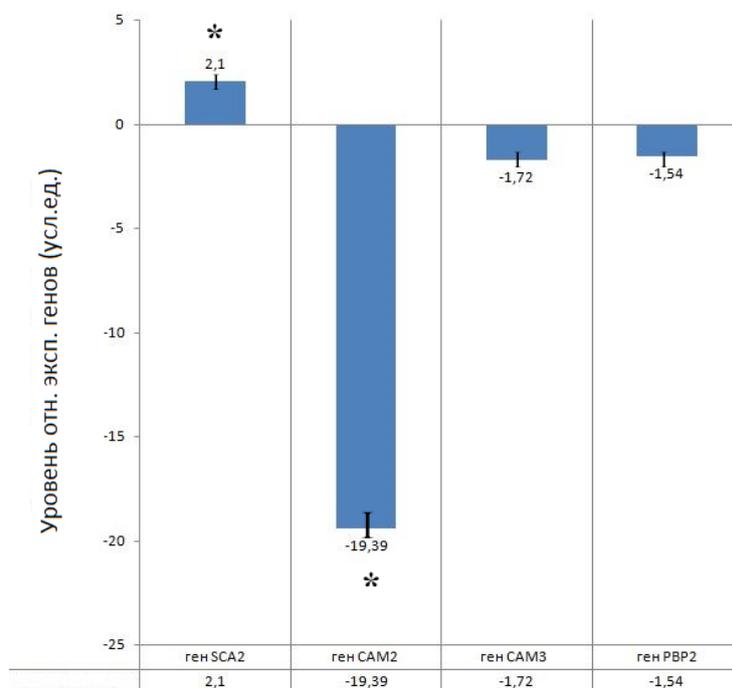


Рис. 4. Изменения уровня относительной экспрессии генов *SCA2*, *PBP2*, *CAM2*, *CAM3* в клетках верхушечных листьев томата после обработки этефоном. * – статистически достоверными признавались данные при величине $p < 0,05$

Fig. 4. Modulation of relative expression of *SCA2*, *PBP2*, *CAM2*, *CAM3* genes after ethephon treatment in cells of tomato leaves. * – significant differences $p < 0.05$

содержания цитоплазматического и увеличение количества апопластического кальция в клетках. Данный факт указывает на то, что для нормального функционирования клеток, подвергнутых гравистимуляции, необходимо поддержание определенного баланса в уровне содержания ионов цитоплазматического и апопластического кальция. Исходя из литературных данных, уровень цитоплазматического кальция повышается в первые минуты после начала действия гравистимула, затем он должен быть снижен для тонкой настройки передачи сигнала, что и достигается, вероятно, с помощью активации *SCA2*. Кроме того, имеется информация о том, что повышение уровня апопластического кальция само по себе может иметь важное значение для реализации гравитропического ответа (контроль процессов подкисления/подщелачивания клеточной стенки и ее размягчения), так что наблюдаемое в наших экспериментах увеличение экспрессии *SCA2* может быть необходимо именно для повышения содержания кальция в апопласте [10].

Влияние гравистимуляции на экспрессию генов кальций-транспортных АТФаз на фоне воздействия этефона в литературе не описано. В настоящей работе впервые показано, что в обработанных этефоном растениях уровень экспрессии гена *SCA2* в изучаемый период воздействия сохраняется низким, что заметно отличается от ответа исследованной изоформы гена на одиночное действие гравистимула. Учитывая, что при данных концентрациях этефон, как показано нами ранее [11], вызывает значительное замедление развития ростовой гравитропической реакции, пониженное накопление транскриптов Ca^{2+} -АТФазы *SCA2* на фоне гравистимуляции после воздействия этефона представляется достаточно логичным. Возможно, что для подавления гравитропической реакции в данных условиях растение поддерживает повышенный уровень содержания цитоплазматического Ca^{2+} более продолжительное время, а уровень апопластического кальция, наоборот, оказывается пониженным, недостаточным для поддержания процесса подкисления клеточной стенки. Возможно также, что уровень содержания ионов кальция в цитоплазме на фоне действия этефона и гравистимула повышается незначительно, что прерывает сигнальную трансдукцию гравистимула и замедляет процесс формирования гравитропического ответа.

Интересно, что в междоузлиях молодых растений сахарного тростника активность кальций-транспортной АТФазы увеличивалась при обработке этефоном в концентрации 100 мг/л. Наши исследования подтверждают увеличение накопления транскриптов гена *SCA2* в молодых верхушечных листьях растений томата при обработке этефоном (без каких-либо других воздействий) в той же концентрации. Возможно, что такое повышение базального уровня активности АТФазы, снижающей уровень содержания цитоплазматического Ca^{2+} , и приводит к ингибированию кальциевого сигнала, характерного для трансдукции одиночного гравистимула.

Для томата описаны 4 изоформы ключевого кальций-зависимого белка – кальмодулина (*SAM1*, *SAM2*, *SAM3*, *SAM6*) [12]. Имеется информация о характере накопления мРНК гена *SAM1* в корнях проростков *Arabidopsis thaliana* (L.) через 30 мин гравистимуляции растений дикого типа и мутанта *agr-3*, характеризующегося пониженным гравитропическим ответом. При воздействии гравистимула в корнях арабидопсиса дикого типа уровень содержания мРНК *SAM1* увеличивался в 3 раза за 0,5 ч, а у *agr-3* экспрессия этого гена была снижена [13].

Полученные нами результаты указывают на достаточно позднее увеличение экспрессии генов изоформ *SAM2*, *SAM3* в клетках верхушечных листьев томата при действии гравитропического стимула – на 3 и 6 ч гравистимуляции, когда интенсивная стадия формирования гравитропического изгиба на морфологическом уровне уже прошла [11]. Эта реакция отличается от описанной для гена *SAM1* в клетках гравистимулированных корней арабидопсиса. Возможно, в формировании раннего гравитропического ответа в верхушечных листьях томата могут принимать другие изоформы кальмодулина (например, *SAM1* или *SAM6*), в то же время изученные нами изоформы должны находиться на пониженном уровне в первые 3 ч ответа.

Особый интерес вызывают полученные нами данные по динамике экспрессии гена *PBP2*, которая претерпевает всплеск на самых ранних этапах ответа (30 мин). Известно, что этот ген кодирует кальций-связывающий белок PBP2 (PID-binding protein), ассоциированный с трансдукцией ауксинового сигнала. PBP2 взаимодействует с серин/треониновой протеинкиназой типа PINOID (PID), важным компонентом передачи ИУК-сигнала, отвечающим за контроль распре-

ления PIN-белков, транспортирующих ауксин из клетки. PID-киназа фосфорилирует PIN-белки, в результате чего они приобретают способность к перемещению с базальной стороны клетки на латеральные, что способствует перераспределению части потока ауксина от корня к различным боковым участкам листа или стебля. Имеется информация о том, что PBP2 является вышестоящим регулятором PID, усиливает его аутофосфорилирующую способность и активирует фосфорилирование им PIN-белков, т. е. является активатором транспорта ауксина в радиальном направлении [14].

В научной литературе имеется информация о том, что ингибиторы кальмодулина усиливают активность PID-киназы *in vivo*. Это позволяет сделать косвенный вывод о том, что фосфорилирующая активность PID усиливается при снижении активности кальмодулина [14]. Также показано, что кальмодулин-подобный белок Tch3 ингибирует активность PID-киназы [14]. В этом контексте логичным выглядят полученные нами данные о том, что кальмодулины, в том числе CAM2/CAM3, проявляют пониженную экспрессию на ранних этапах развития ответа на гравистимул (в отличие от активатора PID-киназы PBP2) и повышают уровень экспрессии лишь после 3 ч воздействия, что, по всей видимости, позволяет растению поддерживать систему PID–PIN в активном состоянии и способствует развитию гравитропического ответа. На фоне действия этефона всплеск экспрессии PBP2 в клетках листьев томата сдвигался на более поздний период (с 30-й минуты на 60-ую), что согласуется с выявленным ранее замедлением формирования гравитропического изгиба, вызываемым этефоном.

Подводя итог рассмотрению полученных данных, следует отметить следующее. На начальной стадии процесса трансдукции гравитационного стимула происходит взаимодействие ауксина со специфическими рецепторами растительных клеток, что приводит к стимуляции процессов их роста растяжением в данной области растительного органа и, как следствие, формированию изгиба. Следующий этап цепи трансдукции – это рост концентрации ионизированного кальция в цитоплазме, который, по все видимости, запускает в клетке процессы ее удлинения. Именно с этой стадией связаны кальмодулин и PBP2-белок, являющиеся кальциевыми мишенями в цитоплазме клетки. Функция АТФаз сводится к тому, что они обеспечивают выкачивание ионов кальция из цитоплазмы в межклеточное пространство или во внутриклеточные кальциевые депо, например, вакуоль. Сравнение временных сдвигов экспрессии участников кальциевого метаболизма позволяет оценить их роль в процессах трансдукции гравитропического стимула, происходящих внутри клетки и связанных с интенсивностью синтетических процессов и приводящих в конечном счете к ее элонгации. Судя по полученным данным, стимул сначала запускает активацию экспрессии гена сигнального PBP-белка (через 30 мин). Почти одновременно с экспрессией PBP растет экспрессия генов АТФаз. Иными словами, можно предположить, что в клетке после запуска трансдукции практически в одно и то же время начинается работа по восстановлению исходного состояния клетки по критерию уровня содержания в цитоплазме ионизированного кальция. Интерпретируя результаты с этефоном, можно сказать, что данный фитогормон сильно меняет общую картину, что связано, по-видимому, с перекрытием цепочек трансдукции фитогормонального действия и гравитропизма и существованием точек кросстока в сложной сети цепей трансдукции химических и физических сигналов в растительной клетке.

Заключение. Изучено влияние гравистимуляции (поворот растений томата на 90° относительно гравитационного поля Земли) на изменение экспрессии генов, кодирующих белки, ассоциированные с кальциевой сигнализацией и транспортом ионов кальция в клетках верхушечных листьев томата на ранних (15 мин – 3 ч) и поздних (более 3 ч – 6 ч) этапах развития гравитропического ответа.

Обнаружена чувствительность экспрессии генов (по критерию транскрипции), кодирующих белки кальций-транспортной АТФазы ПВ типа (SCA2), кальций-связывающего белка ауксиновой сигнализации PBP2, отдельных изоформ кальмодулина (CAM2, CAM3) к действию одиночного гравитропического стимула или совместному действию гравистимула и донора экзогенного этилена этефона.

На ранних этапах гравитропического ответа (30 мин – 3 ч) для генов SCA2, PBP2, CAM2 установлен рост образования их транскриптов.

Обработка растений перед началом гравистимуляции источником экзогенного этилена этефоном приводила к изменениям характера экспрессии изученных генов в ответ на гравистимул, выражающийся либо в изменении амплитуды накопления транскриптов, либо в сдвиге начала реакции во времени.

Следует отметить, что изменения генной экспрессии обнаруживаются не в месте непосредственного гравитропического изгиба, стебле томата, а и в клетках верхушечных листьев растений. Это обстоятельство указывает на то, что к гравистимуляции чувствительны различные ткани и органы растения, что, видимо, позволяет растению быстро адаптироваться к изменениям пространственного положения и восстанавливать нормальную ориентацию в пространстве. Полученные данные свидетельствуют о том, что гравитропический ответ представляет собой сложный комплекс взаимосвязанных молекулярно-генетических реакций на уровне различных систем организма, в том числе ассоциированных с кальциевой сигнализацией и фитогормонами ауксином и этиленом.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект Б19М-109).

Acknowledgements. The work was supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (project Б19М-109).

Список использованных источников

1. Медведев, С. С. Механизмы формирования и физиологическая роль полярности в растениях / С. С. Медведев // Физиология растений. – 2012. – Т. 59, № 4. – С. 543–556.
2. Root gravitropism is regulated by a transient lateral auxin gradient controlled by a tipping-point mechanism / L. R. Band [et al.] // PNAS. – 2012. – Vol. 109, N 12. – P. 4668–4673. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201498109>
3. The role of ionic calcium in the gravitropic response of a creeping chrysanthemum cultivar / S. Zhang [et al.] // Russ. J. Plant Physiol. – 2011. – Vol. 58, N 4. – P. 696–702. <https://doi.org/10.1134/s1021443711040285>
4. Noushina Iqbal Ethylene Role in Plant Growth, Development and Senescence: Interaction with Other Phytohormones / N. Iqbal [et al.] // Front. Plant Sci. – 2017. – Vol. 8. – P. 475. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00475>
5. Li, N. The dual-and-opposing-effect of ethylene on the negative gravitropism of Arabidopsis inflorescence stem and light-grown hypocotyls / N. Li // Plant Science. – 2008. – Vol. 175, N 1–2. – P. 71–86. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.02.001>
6. Mano, E. Gravitropism in Leaves of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh / E. Mano, G. Horiguchi, H. Tsukaya // Plant Cell Physiol. – 2006. – Vol. 47, N 2. – P. 217–223. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci237>
7. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR / M. W. Pfaffl // Nucleic Acids Research. – 2001. – Vol. 29, N 9. – Art. e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
8. Molecular aspects of higher plant P-type Ca²⁺-ATPases / M. Geisler [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta. – 2000. – Vol. 1465, N 1–2. – P. 52–78. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(00\)00131-0](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(00)00131-0)
9. Медведев, С. С. Кальциевая сигнальная система / С. С. Медведев // Физиология растений. – 2005. – Т. 52, № 2. – С. 282–305.
10. Vanneste, S. Calcium: The Missing Link in Auxin Action / S. Vanneste, J. Friml // Plants. – 2013. – Vol. 2, N 4. – P. 650–675. <https://doi.org/10.3390/plants2040650>
11. Суховеева, С. В. Зависимость экспрессии генов, контролирующих транспорт ауксина, от гравистимуляции в листьях растений томата / С. В. Суховеева // Сб. материалов Междунар. науч.-практ. молодежной конф. в рамках Междунар. науч.-практ. инновационного форума «INMAX-2018». – Минск, 2018. – С. 98–101.
12. A Plant Phytosulfokine Peptide Initiates Auxin-Dependent Immunity through Cytosolic Ca²⁺ Signaling in Tomato / H. Zhang [et al.] // Plant Cell. – 2018. – Vol. 30, N 3. – P. 652–667. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00537>
13. The role of calmodulin in the gravitropic response of the *Arabidopsis thaliana agr-3* mutant / W. Sinclair [et al.] // Planta. – 1996. – Vol. 199, N 3. – P. 343–351. <https://doi.org/10.1007/bf00195725>
14. PINOID-Mediated Signaling Involves Calcium-Binding Proteins / R. Benjamins [et al.] // Plant Physiol. – 2003. – Vol. 132, N 3. – P. 1623–1630. <https://doi.org/10.1104/pp.103.019943>

References

1. Medvedev S. Mechanisms and physiological role of polarity in plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2012, vol. 59, no. 4, pp. 502–514. <https://doi.org/10.1134/s1021443712040085>
2. Band L. R., Wells D. M., Larrieu A., Sun J., Middleton A. M., French A. P., Brunoud G., Sato E. M., Wilson M. H., Peret B., Oliva M., Swarup R., Sairanen I., Parry G., Ljung K., Beeckman T., Garibaldi J. M., Estelle M., Owen M. R., Vissenberg K., Hodgman T. C., Pridmore T. P., King J. R., Vernoux T., Bennett M. J. Root gravitropism is regulated by a transient lateral auxin gradient controlled by a tipping-point mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, vol. 109, no. 12, pp. 4668–4673. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201498109>
3. Zhang S., Chen S., Chen F., Jiang B. The role of ionic calcium in the gravitropic response of a creeping chrysanthemum cultivar. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2011, vol. 58, no. 4, pp. 696–702. <https://doi.org/10.1134/s1021443711040285>

4. Iqbal N., Khan N. A., Ferrante A., Trivellini A., Francini A., Khan M. I. R. Ethylene Role in Plant Growth, Development and Senescence: Interaction with Other Phytohormones. *Frontiers in Plant Science*, 2017, vol. 8, pp. 475. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00475>
5. Li N. The dual-and-opposing-effect of ethylene on the negative gravitropism of Arabidopsis inflorescence stem and light-grown hypocotyls. *Plant Science*, 2008, vol. 175, no. 1–2, pp. 71–86. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.02.001>
6. Mano E., Horiguchi G., Tsukaya H. Gravitropism in Leaves of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant and Cell Physiology*, 2006, vol. 47, no. 2, pp. 217–223. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci237>
7. Pfaffl M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 2001, vol. 29, no. 9, art. e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
8. Geisler M., Axelsen K. B., Harper J. F., Palmgren M. G. Molecular aspects of higher plant P-type Ca²⁺-ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, vol. 1465, no. 1–2, pp. 52–78. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(00\)00131-0](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(00)00131-0)
9. Medvedev S. S. Calcium signaling system in plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2005, vol. 52, no. 2, pp. 249–270. <https://doi.org/10.1007/s11183-005-0038-1>
10. Vanneste S., Friml J. Calcium: The Missing Link in Auxin Action. *Plants*, 2013, vol. 2, no. 4, pp. 650–675. <https://doi.org/10.3390/plants2040650>
11. Sukhaveyeva S. Dependence of the expression of genes controlling auxin transport on gravistimulation in tomato plant leaves. *Sbornik materialov Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi molodezhnoi konferentsii v ramkakh Mezhdunarodnogo nauchno-prakticheskogo innovatsionnogo foruma «INMAX-2018»* [Proceedings of the International Scientific and Practical Youth Conference within the framework of the International Scientific and Practical Innovation Forum “INMAX-2018”]. Minsk, 2018, pp. 98–101.
12. Zhang H., Hu Z., Lei C., Zheng C., Wang J., Shao S., Li X., Xia X., Cai X., Zhou J., Zhou Y., Yu J., Foyer C. H., Shi K. A Plant Phytosulfokine Peptide Initiates Auxin-Dependent Immunity through Cytosolic Ca²⁺ Signaling in Tomato. *Plant Cell*, 2018, vol. 30, no. 3, pp. 652–667. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00537>
13. Sinclair W., Oliver I., Maher P., Trewavas A. The role of calmodulin in the gravitropic response of the *Arabidopsis thaliana agr-3* mutant. *Planta*, 1996, vol. 199, no. 3, pp. 343–351. <https://doi.org/10.1007/bf00195725>
14. Benjamins R., Ampudia C. S. G., Hooykaas P. J. J., Offringa R. PINOID-Mediated Signaling Involves Calcium-Binding Proteins. *Plant Physiology*, 2003, vol. 132, no. 3, pp. 1623–1630. <https://doi.org/10.1104/pp.103.019943>

Информация об авторах

Суховеева Светлана Владимировна – научный сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: suhoveevalmbc@mail.ru.

Кабачевская Елена Михайловна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: lbmc@ibp.ogr.by.

Волотовский Игорь Дмитриевич – академик, д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: volotovski@yahoo.com.

Information about the authors

Sukhaveyeva Sviatlana V. – Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: suhoveevalmbc@mail.ru.

Kabachevskaya Alena M. – Ph. D. (Biology), Leading researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lbmc@ibp.ogr.by.

Volotovski Igor D. – Academician, D. Sc. (Biology), Professor, Chief researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: volotovski@yahoo.com.