

УДК 581.1

МЕТАБОЛИЗМ КАЛЛОЗЫ В ВОЛОКНАХ ЛЬНА ПРИ ГРАВИОТВЕТЕ: АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ¹

© 2024 г. Н. Н. Ибрагимова^{а, *}, Н. Е. Мокшина^а

^аКазанский институт биохимии и биофизики — обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия

*e-mail: nibra@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.11.2023 г.

После доработки 23.11.2023 г.

Принята к публикации 23.11.2023 г.

Двигательные реакции растений, относящиеся к тропизмам, обычно осуществляются с использованием механизмов роста растяжением. Однако в данном исследовании изучался гравитропизм на уровне клеток (первичные флоэмные волокна), закончивших свой рост и формирующих утолщенную третичную клеточную стенку. Проведены инвентаризация и анализ экспрессии генов ферментов, ответственных за метаболизм каллозы, на разных стадиях развития флоэмных волокон льна (*Linum usitatissimum* L.) и при гравитропизме. Выявлены гены предполагаемых β -1,3-глюкансинтаз (GSLs) и β -1,3-глюканаз (BGs), имеющие дифференциальный характер экспрессии в исследуемых клетках, среди которых отмечены гены с максимальным уровнем экспрессии на определенной стадии развития. В основном при гравитропизме экспрессия генов β -1,3-глюкансинтазы была понижена, тогда как для генов β -1,3-глюканазы были характерны различные профили экспрессии, среди которых выявлены гены с повышенным уровнем экспрессии только при гравитропизме (*LusBG1* и *LusBG3*). Полученные данные позволили предположить наличие активного метаболизма каллозы в клеточной стенке исследуемых волокон на разных стадиях развития и доминирование деградации каллозы в ходе гравитропизма. Результаты работы закладывают основу для дальнейших исследований функции каллозы в развитии волокон и реализации двигательной реакции растений.

Ключевые слова: гравитропизм, волокно, третичная клеточная стенка, каллоза, β -1,3-глюкансинтазы (каллозосинтазы), β -1,3-глюканазы, экспрессия генов

DOI: 10.31857/S0015330324020086, EDN: OAXKXV

ВВЕДЕНИЕ

Гравитропизм рассматривают как способность различных органов растения располагаться и расти в определенном направлении относительно вектора гравитации. Такое движение для растений играет ключевую роль в их раз-

витии и акклиматизации к окружающей среде. Среди ключевых вопросов — понимание механизмов двигательной реакции. На клеточном уровне растения имеют два основных двигателя. Первый, осмо-гидравлический, реализуется в клетках с первичными клеточными стенками; второй “работает” за счет набухания/сжатия полимеров утолщенных вторичных клеточных стенок, которые формируются в клетках реакционной древесины [1]. Исследованиям этих двигателей посвящены сотни работ, однако многие вопросы остаются открытыми [1, 2]. Считают, что в механизмах второго двигателя задействованы желатинозные волокна растений, широко распространенные в разных органах многих таксонов. Они имеют особый состав и архитектуру клеточной стенки (КС), которая называется либо G-слоем вторичной клеточной стенки, либо третичной клеточной стенкой (ТКС) [2]. Сообщалось, что желатинозные волокна ксилемы ответственны за восстановление вертикального

¹ Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: 10.31857/S0015330324020086

Сокращения: КС — клеточная стенка; ТКС — третичная клеточная стенка; BG — β -1,3-глюканаза; CBM — углевод-связывающий модуль; CTS — С-терминальная гидрофобная последовательность; GH17 — семейство гликозидгидролаз 17; GPI — гликозилфосфатидилинозитол; GSL — β -1,3-глюкансинтаза; iFIBa — интрузивно растущие волокна; OPP — противоположная PUL-стороне (нижняя сторона стебля при подъеме растения); PF — (PFAM) — семейство белковых доменов; PR — pathogenesis-related, связанный с патогенезом; PUL — pulling side (тянущая сторона; верхняя сторона стебля при подъеме растения); tFIBa — ранняя стадия формирования третичной клеточной стенки; tFIBb — поздняя стадия формирования третичной клеточной стенки; TGR — total gene reads, число полных прочтений генов.

положения деревьев в ходе отрицательной гравитропической реакции [3, 4] и сокращение органов, наблюдаемое в корнях и гипокотилых [5, 6]. Первичные флоэмные волокна льна по своим характеристикам относят тоже к желатинозным. Выдвинутые предположения о проявлении контрактильных свойств у волокон при гравитовете дало основание называть их “мускулами” растений [2, 7]. В таких волокнах в ходе гравитропического ответа была обнаружена каллоза [7]. Отложение каллозы показано и в трахеидах древесины сжатия, когда растениям приходилось восстанавливать вертикальное положение [4, 8].

Известно, что отложение каллозы, аморфного β -1,3-глюкана с некоторыми β -1,6 ответвлениями [9], строго контролируется во времени и пространстве. В местах ее отложения изменяются физические и механические свойства КС: повышается жесткость при сохранении гибкости и снижается проницаемость [10]. Эти изменения имеют фундаментальное значение для правильного выполнения многочисленных процессов, таких как деление клеток, развитие мужских гаметофитов, межклеточный транспорт или реакция на биотические и абиотические стрессовые факторы [10]. Локальные отложения каллозы в КС предоставляют возможность контроля переноса воды и растворенных веществ во многих частях растения и на критических стадиях развития [11]. В *Arabidopsis thaliana* L. (резуховидка Таля) β -1,3-глюкансинтазы (каллозосинтазы) кодируются 12 генами, принадлежащими семейству гликозилтрансфераз 48 (в базе данных CAZY) и которые названы как *GLUCAN SYNTHASE-LIKE*, *GSL1–GSL12* [12]. Немного позже другими авторами эти гены были названы *CALS1–CALS12* [13], при этом нумерация не совпадала. В данной работе мы придерживались номенклатуры Richmond и Somerville [12]. Согласно функциональным характеристикам генов *GSL*, представители различных подсемейств играют частично избыточные роли в регуляции множества процессов [10].

Во многих источниках указывают необходимость контроля метаболизма каллозы как путем биосинтеза каллозосинтазами, так и путем ее деградации с помощью β -1,3-глюканаз (BGs). Гены β -1,3-глюканаз экспрессируются в различных тканях растений в зависимости от типа ткани и стадии развития, а также действия биотических и абиотических стрессоров [10, 11]. Растительные β -1,3-глюканазы (BG) принадлежат к семейству гликозидгидролаз GH17 [14]. Используя расширенный филогенетический анализ в сочетании с информацией об экспрессии генов β -1,3-глюканаз и доменной структуры их белковых последовательностей, 50 BGs *A. thaliana* были разделены на пять групп [15]. Следует отметить, что растительным β -1,3-глю-

каназам уделяли значительное внимание как важным участникам взаимодействия растений с микроорганизмами, поскольку большое количество BGs включено в процессы, связанные с патогенезом – pathogenesis-related (PR). Этот тип BGs накапливается в случае атаки патогена. Некоторые из BGs непосредственно участвуют в гидролизе КС патогена, в связи с чем трансгенная экспрессия генов BG широко используется в качестве стратегии для развития устойчивости культурных растений к грибковым патогенам [15]. BGs также участвуют в деградации каллозы при созревании пыльцы, во время роста пыльцевой трубки и при контроле пропускной способности плазмодесм. Накопление и деградация каллозных отложений имеет значение для множества процессов развития, таких как прорастание, рост пазушных почек, органогенез боковых корней, апикальный рост побегов или дифференцировка устьиц [10, 15].

Мы предположили, что в волокнах льна каллозе принадлежит особая роль в ходе реализации гравитропической реакции. Кроме этого, практически отсутствуют данные о наличии каллозы в волокнах в норме на разных стадиях развития. Рост флоэмных волокон льна и отложение утолщенной клеточной стенки разделены во времени и пространстве: после инициации и непродолжительной стадии координированного роста волокно растет интрузивно (скорость роста волокна превышает скорость роста соседних клеток) [16]. После достижения определенной длины (до нескольких сантиметров) волокна льна начинают формировать утолщенную клеточную стенку: тонкий слой вторичной клеточной стенки, а затем третичную клеточную стенку, которая характеризуется высоким содержанием целлюлозы и низким содержанием ксилана и лигнина [2]. Увеличение экспрессии некоторых генов ферментов биосинтеза и деградации каллозы было выявлено в интрузивно растущих волокнах [17], но при этом нет данных об экспрессии генов этих ферментов в волокнах на стадии формирования утолщенной клеточной стенки. В проведенных ранее экспериментах по гравистимуляции растений льна были описаны морфологические изменения волокон, имеющих зрелую ТКС на верхней стороне стебля (“тянущей”, pulling). В этих же волокнах на продольных срезах была обнаружена каллоза в структурах, напоминающие “перетяжки” [7].

Цель работы – анализ экспрессии генов β -1,3-глюкансинтаз и β -1,3-глюканаз, отвечающих за метаболизм каллозы, на уровне отдельных клеток – волокон льна, находящихся на разных стадиях развития и при гравитовете. Это первое исследование, посвященное инвентаризации этих генов и анализу их экспрессии при гравитовете в волокнах льна.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Идентификация генов. В работе при использовании базы данных Phytozome были выявлены последовательности белков, содержащие функциональные домены (PFAM) генов β -1,3-глюкансинтаз (PF02364 и PF04652), и генов, кодирующих гликозидгидролазы 17 (PF00332). Идентифицированные гены у льна (*Linum usitatissimum* L.) были названы в соответствии с ближайшей гомологичной последовательностью *A. thaliana*; функции продуктов всех выявленных генов являются предположительными, поскольку их аннотация построена исключительно на гомологии к охарактеризованным генам *A. thaliana*. Доменную структуру генов анализировали с помощью сервиса InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>). Наличие трансмембранных доменов анализировали с помощью сервиса ТМНММ (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/ТМНММ-2.0/>), GPI-якорь (гликозилфосфатидилинозитол) предсказывали с помощью сервиса NetGPI-1.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetGPI-1.1/>).

Уровень экспрессии генов. Для оценки экспрессии генов мы использовали полученные нами ранее транскриптомные данные для растений льна (фаза быстрого роста), которые размещены в базе данных FIBexDB (<https://ssl.cres-t.org/fibex/flax/>). В FIBexDB транскриптомные данные из девяти разных проектов (61 образец) нормализованы и сведены в единую информационную базу с соответствующей статистической обработкой значений дифференциальной экспрессии, включая оценку критериев достоверности (P и q) [18]. Все транскриптомные данные были ранее опубликованы, ссылки на

номера проектов в NCBI с сырыми данными приведены на рисунке 1. Для анализа брали флоэмные волокна до формирования ТКС (фаза интрузивного роста) – (iFIBa), на начальной стадии формирования ТКС – (tFIBa), на поздней стадии формирования ТКС (tFIBb) и на разных сторонах стебля (PUL – верхняя при подъеме растения, OPP – нижняя) поздней стадии формирования ТКС. Экспрессию генов в волокнах анализировали через 8, 24 и 96 ч после наклона растений (рис. 1). Обсуждаются более чем двукратные достоверные ($q < 0.05$) изменения экспрессии между контрольными (tFIBb) и гравистимулированными растениями (PUL и OPP). На рисунках 2–6 представлены значения средних и стандартные отклонения, знаком “*”, “b”, “c” отмечены достоверные различия между образцами при $q < 0.05$. Для подтверждения достоверного различия между PUL и OPP дополнительно проводили t -test при $P < 0.05$.

Филогенетический анализ. Отбор аминокислотных последовательностей для филогенетического анализа проводили в базе данных Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) по соответствующим номерам PFAM. Предварительно аминокислотные последовательности *A. thaliana* и *L. usitatissimum* были выравнены в веб-сервисе M-Coffee (<https://tcoffee.crg.eu/>): для GSLs использовали PSI/TM-Coffee (алгоритм для выравнивания мембраносвязанных белков), для GH17 – M-Coffee. Укороченные последовательности не использовали для выравнивания. Для построения филогенетического дерева аминокислотных последовательностей GSLs *A. thaliana* (12) и *L. usitatissimum* (27) использовали метод Q.pfam+I+G4, для GH17

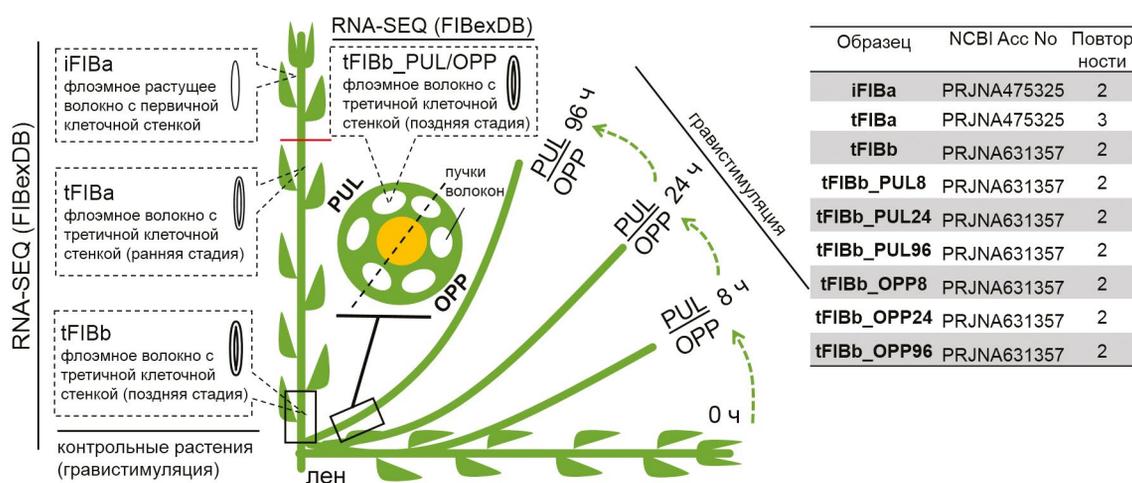


Рис. 1. Схема отбора образцов (изолированных волокон льна) для оценки экспрессии генов. Данные экспрессии загружены в FIBexDB [18]; iFIBa – интрузивно растущие волокна, tFIBa – ранняя стадия формирования ТКС (третичной клеточной стенки), tFIBb – поздняя стадия формирования ТКС; 8, 24, 96 ч – время фиксации образцов после наклона стебля; PUL – pulling side (тянущая сторона), OPP – противоположная PUL-стороне. Справа в таблице приведены номера проектов в NCBI, в которых опубликованы сырые данные транскриптомных анализов. Нормализованные данные для всех транскриптомных экспериментов можно найти в FIBexDB (<https://ssl.cres-t.org/fibex/flax/>).

A. thaliana (51) и *L. usitatissimum* (86) — метод Q.pfam+R7; ультрафаст бутстреп поддержка составила 10 000. Расчеты моделей и деревьев выполнены в программе IQTREE (<http://www.iqtree.org/>, версия 2.2.2.6), визуализация выполнена с помощью сервиса iTOL (<https://itol.embl.de/>). Деревья для двух классов ферментов приведены в дополнительных материалах электронной версии статьи.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Идентификация и анализ уровня экспрессии генов предполагаемых β -1,3- β -глюкансинтаз в волокнах льна. Всего в геноме льна было выявлено 28 генов (26 генов с PF02364, 2 гена с PF04652) *LusGSLs*, гомологичных 10 генам *A. thaliana* (рис. 2; Дополнительные материалы, рис. 1). Согласно филогенетическому анализу, наибольшая диверсификация характерна для льняных последовательностей, гомологичных ATGSL2 и кладе ATGSL7/11. Далее по тексту ближайшие гомологи обсуждаемых генов по *A. thaliana* (согласно филогенетическому анализу и результатам BLAST) будут приводиться в скобках.

Были выявлены *LusGSLs* с явным максимум экспрессии на определенной стадии развития волокна, которые были разделены на четыре кластера (рис. 2). *Lus10002096* (*ATGSL2*), *Lus10000830* (*ATGSL2*) и *Lus10030030* (*ATGSL5*) — гены, имеющие максимум в волокнах со зрелой ТКС (рис. 2, кластер 1). *Lus10037469* (*ATGSL6*) имел максимум экспрессии в начале формирования ТКС с ее уменьшением более чем в три раза в волокнах со зрелой ТКС (рис. 2, кластер 2). *Lus10039199* (*ATGSL12*) и *Lus10013744* (*ATGSL12*) имели максимальный уровень экспрессии на стадии интрузивного роста с достоверным уменьшением экспрессии в 5–10 раз в волокнах со зрелой ТКС (рис. 2, кластер 3). Около половины генов вошли в четвертый кластер, в который были объединены гены с максимумом экспрессии на стадии интрузивного роста, а также на ранней стадии формирования ТКС (рис. 2). В целом при гравистимуляции изменение экспрессии в волокнах наблюдали у 21 гена (достоверно по сравнению с контролем хотя бы в одной временной точке). Среди них только для *Lus10014601* (*ATGSL1*), *Lus10042478* (*ATGSL4*) и паралога *Lus10033689* и *Lus10031648* (общий ближайший гомолог *ATGSL5*) было отмечено увеличение экспрессии в волокнах при гравистимуляции по сравнению с волокнами контрольных растений (рис. 2). Среди оставшихся 17 генов *LusGSLs* было показано достоверное уменьшение экспрессии в волокнах при гравистимуляции по сравнению с волокнами контрольных растений (рис. 2). Разная динамика экспрессии

выделенных генов представлена на рисунках 3а и 3б. Мы исключили из дальнейшего анализа ген *Lus10000831* ввиду отсутствия у транслированной последовательности трансмембранного домена, необходимого для белков этого семейства, при этом ген *Lus10000830* (соседний локус) имел аналогичную динамику экспрессии и его транслированная белковая последовательность включала пять трансмембранных доменов. По похожим причинам не рассматривали ген *Lus10020751* (соседство с локусом *Lus10020750* и уменьшенное количество трансмембранных доменов). Мы также исключили из дальнейшего анализа ген *Lus10033482* по причине низких значений экспрессии (TGR < 16 в образцах в эксперименте с гравистимуляцией).

Среди отобранных генов нами была выделена группа высокоэкспрессирующихся генов, уменьшение экспрессии которых более чем в три раза наблюдалось через 24 ч после наклона (рис. 4а). В нее вошли четыре гена *Lus10020750*, *Lus10001424*, *Lus10001056*, *Lus10007327*, которые имели один общий ближайший гомолог в *A. thaliana* *AT1G06490*, аннотированный как *ATGSL7*. Данные гены к тому же имели похожий профиль экспрессии с максимумом в волокнах на стадии интрузивного роста. Гены с более низким уровнем экспрессии (*Lus10002097*, *Lus10000830*, *Lus10033483*; ближайшим гомологом является *AT2G13680* (*ATGSL2*)) (рис. 4б) имели различия в экспрессионных максимумах, проявляющихся на разных стадиях развития волокна, но при этом все они имели похожий профиль экспрессии при гравистимуляции: незначительное уменьшение через 8 ч после наклона, максимальное уменьшение (более чем в три раза по сравнению с контролем) через 24 ч после наклона и небольшое увеличение к концу реакции (96 ч).

Таким образом, большинство генов *LusGSL* имели максимум экспрессии в волокнах на стадии интрузивного роста, когда молодые волокна активно растут интрузивно, достигая в длину нескольких сантиметров [16], и в волокнах на ранней стадии формирования ТКС. В ходе гравитоответа для *LusGSL* в основном наблюдали понижение экспрессии (более выраженное в волокнах PUL-стороны стебля), кроме предполагаемых *LusGSL5*, *LusGSL4* и *LusGSL1*. Максимальное понижение в ходе гравитоответа проявляли высокоэкспрессируемые гены, гомологичные *ATGSL7* и *ATGSL2*.

Идентификация и анализ уровня экспрессии генов β -1,3-глюканаз в волокнах льна. В геноме льна было выявлено 96 генов, кодирующих гликозидгидролазы 17 (GH17, PF00332) и соответствующих 34 гомологам в *A. thaliana*. Для этого семейства гидролаз в базе данных CAZY (<http://www.cazy.org/GH17.html>) описаны следующие

	Lus	PFAM	At	iFIBa	tFIBa	CTR	PUL8	PUL24	PUL96	OPP8	OPP24	OPP96
						tFIBb						
①	<i>Lus10002096</i>	PF02364	AT2G13680_GSL2	768 ^{bc}	1110 ^c	1540	1411	625*	844*	1159	658*	837*
	<i>Lus10000830</i>	PF02364	AT2G13680_GSL2	78 ^c	50 ^c	169	89*	33*	47*	98*	30*	53*
	<i>Lus10030030</i>	PF02364	AT4G03550_GSL5	1 ^c	6 ^c	92	46	19	3*	27	20	5*
②	<i>Lus10000831</i>	PF02364	AT2G13680_GSL2	15	9	27	17	2*	6	15	4	6
	<i>Lus10037469</i>	PF02364	AT1G05570_GSL6	3423 ^{bc}	6910 ^c	2257	1785	1130*	2417	2251	1447*	2196
	<i>Lus10020893</i>	PF02364	AT2G13680_GSL2	113 ^c	160 ^c	64	63	25*	26*	63	35	49
③	<i>Lus10033483</i>	PF02364	AT2G13680_GSL2	42	83	59	48	17*	31	68	23	31
	<i>Lus10033482</i>	PF02364	AT2G13680_GSL2	18	73	6	4	1	1	6	3	1
	<i>Lus10039199</i>	PF02364	AT5G13000_GSL12	10625 ^{bc}	4951 ^c	1933	2205	832*	2165	2042	1029*	1690
④	<i>Lus10013744</i>	PF02364	AT5G13000_GSL12	8335 ^{bc}	4205 ^c	1858	1862	862*	1705	1981	1034*	1456
	<i>Lus10039828</i>	PF02364	AT4G03550_GSL5	436 ^b	139 ^c	37	52	35	36	40	45	32
	<i>Lus10000266</i>	PF02364	AT4G03550_GSL5	401 ^b	128 ^c	36	50	34	35	40	44	32
	<i>Lus10014601</i>	PF02364	AT4G04970_GSL1	191 ^{bc}	104	81	106	51	60	155*	89	55
	<i>Lus10032463</i>	PF02364	AT3G07160_GSL10	5056 ^c	4401 ^c	1305	1392	1049	1410	1408	1178	1261
	<i>Lus10003920</i>	PF02364	AT1G05570_GSL6	4687 ^c	5318 ^c	1893	1530	795*	1549	1877	1035*	1366
	<i>Lus10014796</i>	PF02364	AT2G36850_GSL8	4292 ^c	3746 ^c	1588	1515	1030*	1243	1502	1060*	1102*
	<i>Lus10042478</i>	PF02364	AT3G14570_GSL4	4176 ^c	4089 ^c	1414	2364	960	1098	2943*	1142	1231
	<i>Lus10042959</i>	PF02364	AT3G07160_GSL10	3496 ^c	2958 ^c	1067	971	618*	924	1004	714*	747*
	<i>Lus10020750</i>	PF02364	AT1G06490_GSL7	2815 ^c	2271	1306	938	356*	1021	1060	511*	879
	<i>Lus10040891</i>	PF02364	AT2G36850_GSL8	2269 ^c	2254 ^c	1637	1442	853*	1121*	1288	786*	1030*
	<i>Lus10033689</i>	PF02364	AT4G03550_GSL5	2151 ^c	2183 ^c	334	760*	808*	810*	757*	997*	710*
	<i>Lus10031648</i>	PF02364	AT4G03550_GSL5	1736	1691 ^c	234	532*	463*	578*	486*	571*	492*
	<i>Lus10001424</i>	PF02364	AT1G06490_GSL7	1482 ^c	1190 ^c	711	430	121*	271*	422	144*	254*
	<i>Lus10001056</i>	PF02364	AT1G06490_GSL7	1346 ^c	1027	792	439	131*	285*	427*	139*	271
	<i>Lus10007327</i>	PF02364	AT1G06490_GSL7	738	587	575	364	107*	289*	371	143*	249*
	<i>Lus10002097</i>	PF02364	AT2G13680_GSL2	383 ^c	285	135	114	5*	38*	123	28*	24*
	<i>Lus10020751</i>	PF04652	AT1G06490_GSL7	1996	1494 ^c	219	198	37*	201	206	110	166
	<i>Lus10037471</i>	PF04652	AT2G31960_GSL3	1470 ^b	343	200	228	260	272	214	255	207

Рис. 2. Перечень генов β -1,3-глюкансинтаз (PF02364, PF04652) и их экспрессия в волокнах льна на разных стадиях развития и при гравистимуляции (в TGR) с разбивкой на кластеры 1–4. Гены, экспрессия которых была достоверно снижена при гравистимуляции в волокнах стебля льна, обозначены синим; гены, экспрессия которых достоверно увеличивалась в волокнах при гравистимуляции по сравнению с экспрессией в волокнах контрольных растений (tFIBb), обозначены красным. * (^c) – Различия с контролем (tFIBb) и ^b – различия с tFIBa достоверны при $q < 0.05$. Серым фоном выделены гены, экспрессию которых не рассматривали. iFIBa – интрузивно растущие волокна, tFIBa – ранняя стадия формирования ТКС (третичной клеточной стенки). tFIBb – поздняя стадия формирования ТКС, которая служила контролем (CTR) в эксперименте с гравистимуляцией. 8, 24, 96 ч – время фиксации образцов после наклона стебля; PUL – pulling side (тянущая сторона), OPP – противоположная PUL-стороне. Lus – последовательности льна *Linum usitatissimum*, At – последовательности *Arabidopsis thaliana*.

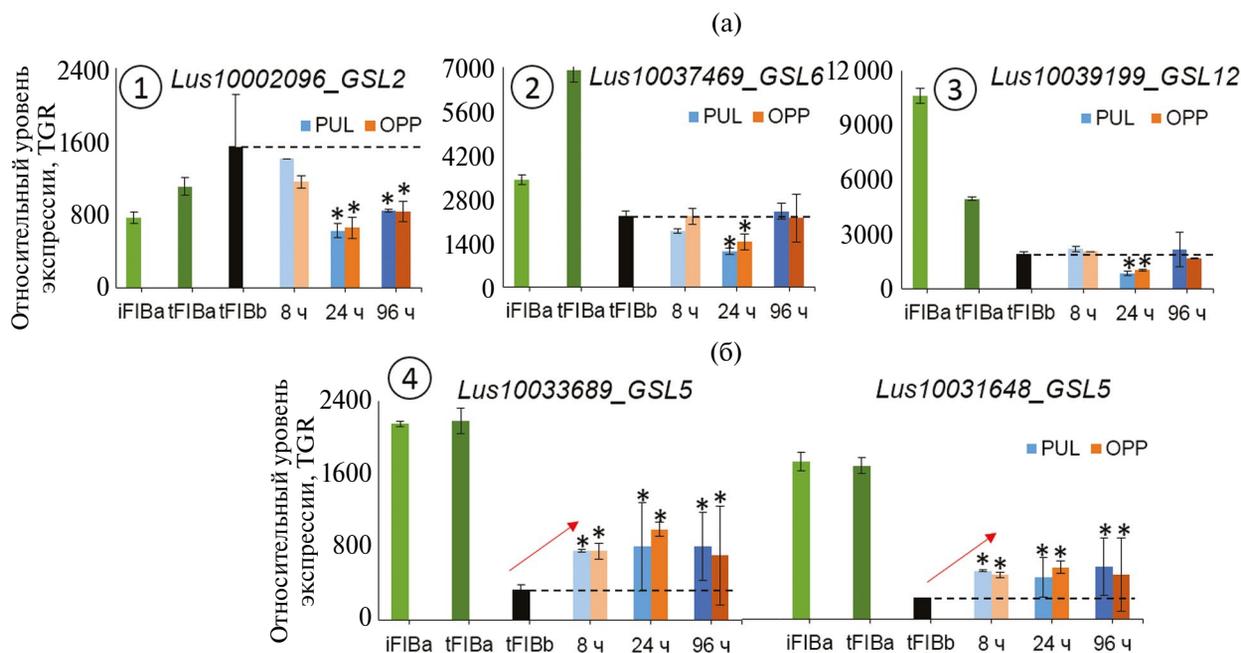


Рис. 3. Экспрессия генов β -1,3-глюкансинтаз (PF02364) в волокнах стебля льна из кластеров 1–4 с максимумом на разных стадиях развития и уменьшением экспрессии при гравитовете (а), а также резко понижающих экспрессию в волокнах со зрелой клеточной стенкой (tFIBb) по сравнению с iFIBa и tFIBa, но активирующихся при гравитовете (б). * – Различия с контролем достоверны при $q < 0.05$. iFIBa – интрузивно растущие волокна, tFIBa – ранняя стадия формирования ТКС (третичной клеточной стенки). tFIBb – поздняя стадия формирования ТКС. 8, 24, 96 ч – время фиксации образцов после наклона стебля; PUL – pulling side (тянущая сторона), OPP – противоположная PUL стороне. Черной пунктирной линией обозначен уровень экспрессии в контрольных растениях без гравистимуляции.

активности: глюкан эндо-1,3-β-глюкозидаза (EC 3.2.1.39); лихеназа (EC 3.2.1.73); АБК-специфическая β-глюкозидаза (EC 3.2.1.175); β-1,3-глюкан-трансгликозидаза (EC 2.4.1.-); β-1,3-глюкозидаза (EC 3.2.1.-). Во льне это семейство, главным образом, представлено β-1,3-глюканазами (BGs). В нашем исследовании 69 из 96 генов *GH17* экспрессировались во флоэмных волокнах на разных стадиях развития (TGR > 16 хотя бы в одном из образцов). Треть всех экспрессируемых генов *GH17* была активирована в волокнах во время интрузивного роста. Для дальнейшего анализа мы отобрали 21 ген, экспрессия которых в три и более раза изменялась в волокнах при гравистимуляции в любой временной точке по сравнению с контролем (tFIBb) (рис. 5). Согласно филогенетическому анализу, обсуждаемые гены принадлежат к разным группам обширного семейства *GH17* и, по всей видимости, для них характерна эндо- и экзогидролазная активность, при этом многие ферменты аннотированы как *GH17* без указания на тип активности (рис. 5; Дополнительные материалы, рис. 2).

По профилю экспрессии мы выделили четыре группы генов. В первую вошли гены *Lus10015151*,

Lus10016539, *Lus10033244*, *Lus10034607*, *Lus10040808*, *Lus10016032*, имеющие максимальное значение экспрессии в волокнах во время интрузивного роста. При формировании ТКС эти значения падали, но при гравистимуляции мы наблюдали их повышение до значений экспрессии в волокнах на ранней стадии формирования ТКС (иногда — до значений экспрессии в интрузивно растущих волокнах), часто с максимумом через 24 ч после наклона. После подъема растений (96 ч) значения экспрессии в волокнах гравистимулированных растений были выше контрольных значений. Такая закономерность имела место в волокнах обеих сторон стебля растений льна (PUL и OPP) (рис. 5). Вторая группа генов (*Lus10012080*, *Lus10032719*, *Lus10023576*) имела максимальные значения экспрессии в волокнах на ранней стадии формирования ТКС и пониженные значения экспрессии в волокнах со зрелой ТКС; при гравистимуляции уровень экспрессии этих генов также повышался. В итоге, к моменту подъема растений (96 ч) значения экспрессии (PUL и OPP) возрастали и были близки тем, что наблюдали в волокнах на ранней стадии формирования ТКС. В третью

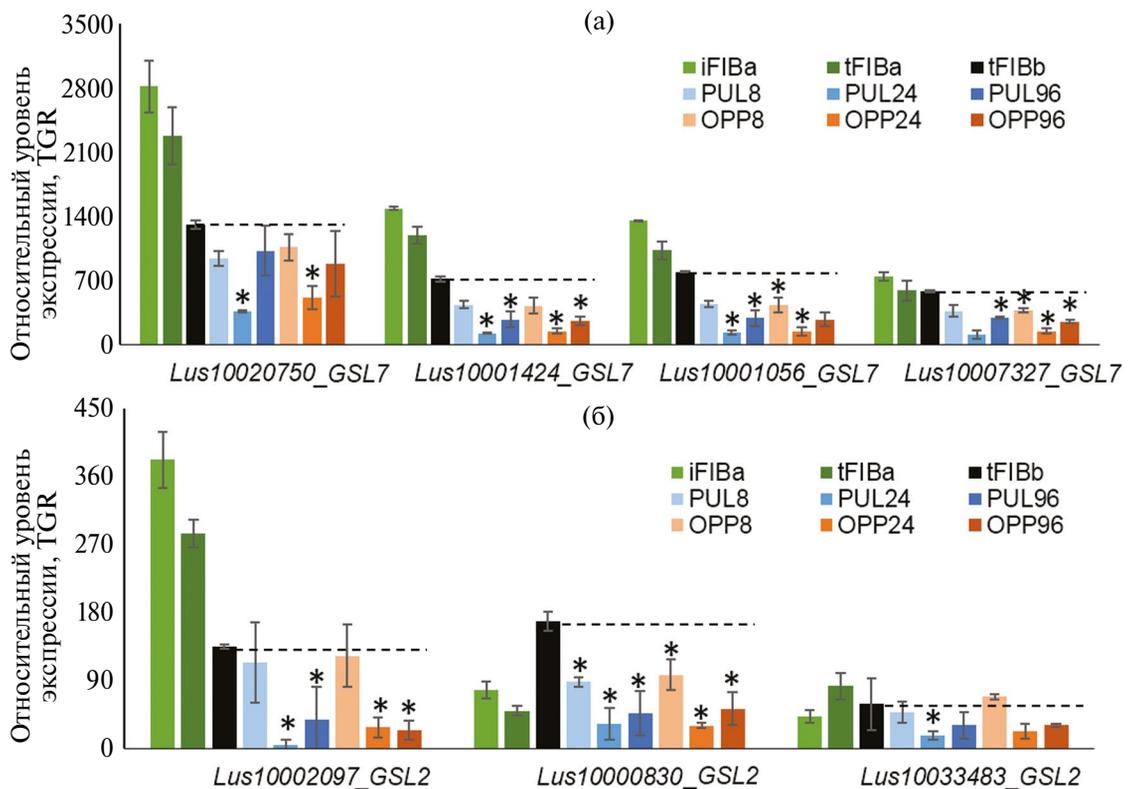
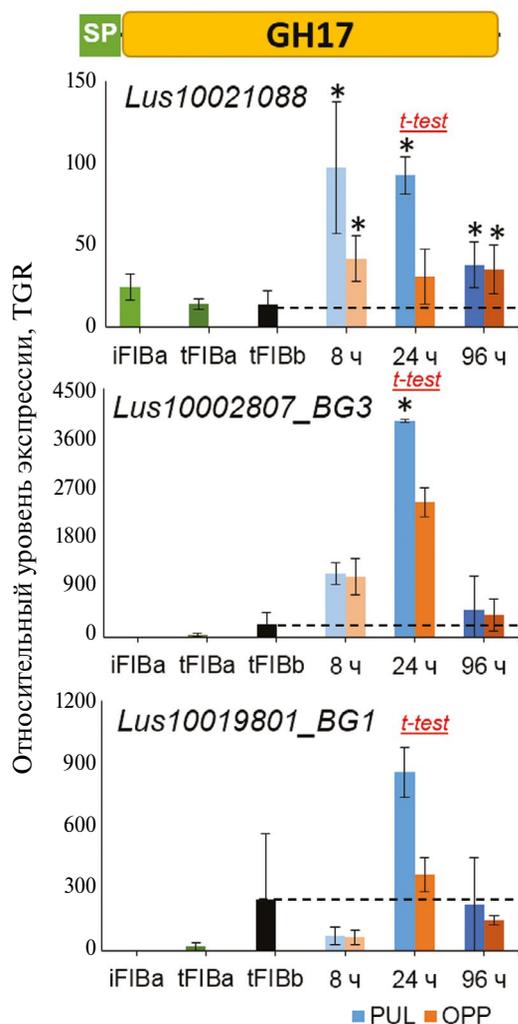


Рис. 4. Гены β-1,3-глюкансинтаз (PF02364), гомологичные ATGSL7 (а) и ATGSL2 (б), имеющие высокий уровень экспрессии в волокнах льна на разных стадиях развития, но понижающие экспрессию при гравистимуляции. * – Различия с контролем достоверны при $q < 0.05$. iFIBa – интрузивно растущие волокна, tFIBa – ранняя стадия формирования ТКС (третичной клеточной стенки), tFIBb – поздняя стадия формирования ТКС. 8, 24, 96 ч – время фиксации образцов после наклона стебля; PUL – pulling side (тянущая сторона), OPP – противоположная PUL стороне. TGR – total gene reads. Черной пунктирной линией обозначен уровень экспрессии в контрольных растениях без гравистимуляции.

Описание в Phytosome	Lus	At	CTR								
			iFIBa	tFIBa	tFIBb	PUL8	PUL24	PUL96	OPP8	OPP24	OPP96
① O-GLYCOSYL HYDROLASE 17 GLUCOSIDASE-LIKE ENDO-1,3-BETA-GLUCOSIDASE 10_R ENDO-1,3-BETA-GLUCOSIDASE 3 GLUCOSIDASE-LIKE GLUCOSIDASE-LIKE	<i>Lus10015151</i>	<i>AT2G05790</i>	1556 ^a	466 ^c	188	424 ^a	671 ^a	348 ^a	378 ^a	739	323 ^a
	<i>Lus10016539^a</i>	<i>AT3G46570</i>	720 ^{bc}	403 ^c	185	599 ^a	659 ^a	272	592 ^a	623	296 ^a
	<i>Lus10033244^a</i>	<i>AT1G32860</i>	527 ^c	278 ^c	96	433 ^a	853 ^a	547 ^a	235 ^a	743	384 ^a
	<i>Lus10034607^a</i>	<i>AT2G01630</i>	369 ^c	94 ^c	75	94	306 ^a	138	109	330	128
	<i>Lus10040808^a</i>	<i>AT3G46570</i>	504 ^b	124 ^c	66	228 ^a	128 ^a	101	193 ^a	126	86
② ENDO-1,3-BETA-GLUCOSIDASE 7_R ENDO-1,3-BETA-GLUCOSIDASE 7_R ENDO-1,3-BETA-GLUCOSIDASE 7_R ENDO-1,3-BETA-GLUCOSIDASE 7_R	<i>Lus10012080</i>	<i>AT5G42720</i>	3238 ^b	5811 ^c	1348	2139	2146	4072 ^a	2398	2483	3102
	<i>Lus10032719</i>	<i>AT5G42720</i>	363 ^b	1094 ^c	325	588	646	1070 ^a	538	733	857
	<i>Lus10023576</i>	<i>AT5G42720</i>	46 ^{bc}	399 ^c	100	248 ^a	324 ^a	251 ^a	324 ^a	290 ^a	217 ^a
	<i>Lus10002807</i>	<i>AT3G57240_BG3</i>	1 ^{bc}	40	230	1149	3920 ^a	490	1095	2445	400
	<i>Lus10027860</i>	<i>AT3G57260_BG2</i>	1 ^{bc}	202	224	188	1948	200	135	1276	272
③ β-1,3-GLUCANASE β-1,3-GLUCANASE β-1,3-GLUCANASE β-1,3-GLUCANASE β-1,3-GLUCANASE GLUCOSIDASE-LIKE PROTEIN ENDO-1,3-BETA-GLUCOSIDASE O-GLYCOSYL HYDROLASE 17	<i>Lus10014109</i>	<i>AT3G57270_BG1</i>	1 ^{bc}	19	101	44	605	122	45	305	77
	<i>Lus10027859</i>	<i>AT3G57240_BG3</i>	1 ^{bc}	18	39	82	149	28	94	74	24
	<i>Lus10019801</i>	<i>AT3G57270_BG1</i>	1 ^{bc}	20 ^c	244	71	857	220	65	367	144
	<i>Lus10021088</i>	<i>AT3G46570</i>	24	14	14	97 ^a	93 ^a	38 ^a	42 ^a	31	35 ^a
	<i>Lus10013016</i>	<i>AT5G55180</i>	7 ^c	13 ^c	45	80	35	14 ^a	78	25 ^a	13 ^a
④ O-GLYCOSYL HYDROLASE 17 O-GLYCOSYL HYDROLASE 17 O-GLYCOSYL HYDROLASE 17 O-GLYCOSYL HYDROLASE 17 O-GLYCOSYL HYDROLASE 17	<i>Lus10025892</i>	<i>AT3G07320</i>	416 ^c	260 ^c	1352	1556	385 ^a	568 ^a	1119	381 ^a	659
	<i>Lus10006659</i>	<i>AT2G26600</i>	244 ^{bc}	557 ^c	771	439 ^a	299 ^a	443 ^a	433 ^a	247 ^a	508 ^a
	<i>Lus10043075^a</i>	<i>AT5G20870</i>	138 ^{bc}	301	423	119 ^a	130 ^a	182	133 ^a	118 ^a	156 ^a
	<i>Lus10001183^a</i>	<i>AT5G20870</i>	101 ^{bc}	232	327	107 ^a	94 ^a	127	116 ^a	94 ^a	137 ^a
	<i>Lus10002808</i>	<i>AT5G67460</i>	196	156	223	100 ^a	66 ^a	215	145	67 ^a	170

Рис. 5. Перечень генов гликозидгидролаз 17 семейства (PF00332) и их экспрессия в волокнах стебля льна (в TGR). Слева от тепловой карты – гены льна (и их ближайшие гомологи в *Arabidopsis thaliana*), проявляющие изменение экспрессии при гравитовете более чем в 3 раза (как минимум, в одном образце); выделены гены, максимально экспрессируемые только в воде гравитовета. *^(c) – Различия с контролем (tFIBb) и ^b – различия с tFIBa достоверны при $q < 0.05$. iFIBa – интрузивно растущие волокна, tFIBa – ранняя стадия формирования ТКС (третьичной клеточной стенки). tFIBb – поздняя стадия формирования ТКС, которая служила контролем (CTR) в эксперименте с гравитостимуляцией. 8, 24, 96 ч – время фиксации образцов после наклона стебля; PUL – pulling side (тянущая сторона), OPP – противоположная PUL стороне. Lus – последовательности льна *Linum usitatissimum*, At – последовательности *Arabidopsis thaliana*. BG – β-1,3-glucanase. Справа отмечены образцы, в которых экспрессия гена была максимальной. § – предсказанный GPI-якорь (коэффициент 0.173–0.503).



группу вошли гены *Lus10002807*, *Lus10019801* и *Lus10021088*, у которых происходило значительное увеличение экспрессии в волокнах только при гравитовете (рис. 6). При этом у всех представителей этой группы рост экспрессии более ярко был выражен в PUL-образцах через 24 ч, иногда превышая OPP в несколько раз. Однако через 96 ч наблюдалось снижение экспрессии и ее выравнивание между PUL и OPP. Доменная структура белков, кодируемых генами этой группы, включала только домен семейства гликозидгидролаз 17 (GH17) (домен X8, который содержат некоторые представители PF00332 выявлен не был). Все белки содержали сигнальный пептид, что позволяет предполагать их секрецию в клеточную стенку. В четвертую группу вошли гены,

Рис. 6. Гены β-1,3-глюканаза, экспрессия которых повышалась в PUL-волокнах при гравитостимуляции по сравнению с OPP. Сверху представлена доменная организация соответствующих белковых последовательностей: SP – сигнальный пептид, GH17 – Glycosylde hydrolase family 17. * – Различия с контролем достоверно при $q < 0.05$; t-test – различия между образцами достоверны при $P < 0.05$. iFIBa – интрузивно растущие волокна, tFIBa – ранняя стадия формирования ТКС (третьичной клеточной стенки), tFIBb – поздняя стадия формирования ТКС. 8, 24, 96 ч – время фиксации образцов после наклона стебля; PUL – pulling side (тянущая сторона), OPP – противоположная PUL стороне. TGR – total gene reads. Черной пунктирной линией обозначен уровень экспрессии в контрольных растениях без гравитостимуляции.

которые имели максимум экспрессии в волокнах со зрелой ТКС и понижали экспрессию при гравистимуляции на обеих сторонах стебля (рис. 5).

Таким образом, в результате анализа экспрессии генов ферментов GH17 было показано, что для каждой стадии развития волокна соответствует разный набор активирующихся генов. Были выявлены β -1,3-глюканазы, экспрессия которых значительно повышалась только в ходе гравитропической реакции, при этом пик экспрессии для большинства генов этой группы приходился на 24 ч.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что реабилитация пространственного положения стебля растения льна связана с модификацией флоэмных волокон, формирующих ТКС, что предполагает важную роль этих клеток в гравитропическом ответе. В таких волокнах на PUL-стороне была обнаружена каллоза [7]. В данной работе в результате инвентаризации в геноме льна выявлено 28 генов, гомологичных генам β -1,3-глюкансинтаз (CALSs/GSL), и 96 генов, гомологичных генам гликозидгидролаз 17 семейства (GH17). Проведен анализ их экспрессии на разных стадиях развития волокна и при гравистимуляции. При гравистимуляции изучали клетки (флоэмные волокна), закончившие свой рост и формирующие ТКС. Нужно отметить, что стадии развития волокон разделены во времени и пространстве (рис. 1), что позволяет исследовать стадия-специфичные процессы и находить стадия-специфичные гены.

В ходе гравистимуляции экспрессия генов большинства предполагаемых β -1,3-глюкансинтаз в волокнах льна понижается. Большинство выявленных в геноме льна генов *GSLs* имели максимальный уровень экспрессии в волокнах на стадии интрузивного роста и сохраняли достаточно высокий уровень на стадии начала формирования ТКС (рис. 2, кластеры 3, 4). Важность кодируемых ими ферментов связывают с их участием в биосинтезе каллозы, необходимой для закрытия плазмодесм при переходе волокна от координированного роста к интрузивному [17]. У некоторых генов этой группы при гравитропическом ответе экспрессия достоверно снижалась в образцах, полученных через 24 ч (96 ч) после наклона растений, соответствующие гомологи – *AT5G13000 (GSL12)*, *AT1G05570 (GSL6)*, *AT2G36850 (GSL8)* и *AT3G07160 (GSL10)*. Что примечательно, для всех продуктов этих генов показано участие в проницаемости плазмодесм [19–23]. Например, для *ATGSL6 (CALS1)* продемонстрировано участие в отложении каллозы в плазмодесмах (ПД) в ответ на обработку салициловой кислотой [19], а также участие в закрытии ПД в ходе иммун-

ной реакции у *A. thaliana* [20]. Необходимо отметить, что среди высокоэкспрессируемых генов этой группы мы выделили также гены, которые достоверно уменьшали экспрессию в ходе гравистимуляции на обеих сторонах стебля и имели общего ближайшего гомолога *ATGSL7* (рис. 4а). Продукт этого гена в *A. thaliana* также участвовал в отложении каллозы в ПД [23]. Мутантные формы, дефектные по *CALS7*, демонстрировали пониженное накопление каллозы в ПД зарождающихся ситовидных пластинок и стенках радиальных ситовидных элементов на ранней стадии развития флоэмы (стадия перфорации) в проростках *A. thaliana*, что в конечном итоге приводило к формированию ситовидных элементов с меньшим количеством ПД [23]. Однако экспрессия *GSL7* обнаружена только в ситовидных элементах флоэмы и сопутствующих клетках, что предполагает тканеспецифичный характер экспрессии *GSL7* [23]. В подтверждение этого, мутанты *gs17* не обнаруживали каких-либо других фенотипических дефектов, откуда следует, что *GSL7* не выполняет никаких других биологических функций, кроме специфичного для флоэмы синтеза каллозы в ПД [10]. При этом следует отметить, что в интрузивно растущих волокнах не обнаружено плазмодесм, которые присутствуют на стадии координированного роста, а потом исчезают, и волокно становится симпластически изолированным [16]. Мы допускаем, что в процессе выделения волокон были частично захвачены граничащие с волокнами проводящие элементы флоэмы, но также и не исключаем экспрессии этого гена в первичных волокнах флоэмы. В любом случае, экспрессия данного гена уменьшалась при гравитропическом ответе более чем в три раза. Возможно, это необходимо, чтобы поддерживать активный транспорт ассимилятов по флоэме в ходе гравитропического ответа.

Часть генов *GSL* (около 15%) имела максимальные значения экспрессии в волокнах со зрелой КС и сильное уменьшение экспрессии при гравитропическом ответе, достигающее до значений экспрессии во время интрузивного роста: *Lus10000830*, *Lus10002096*, *Lus10033483 (AT2G13680 (ATGSL2))*. Показано, что глюкансинтаза *ATGSL2* активируется, главным образом, на поздней стадии развития пыльцы и пыльцевой трубки [10]. В растущей пыльцевой трубке каллоза является преобладающим полисахаридом в субапикальной КС, придающим ей одновременно жесткость и гибкость, возможно, при взаимодействии с целлюлозой. Механические свойства КС пыльцевой трубки позволяют пыльцевой трубке эффективно перемещаться [10]. Показано, что за отложение каллозных пробок в пыльцевых трубках отвечает *GSL2* [(10)]. Исследуемые нами флоэмные волокна – очень длинные клетки, где ранее обнаружены каллозные пробки [7]. Повышенная экспрес-

сия *LusGSL2* в волокнах с ТКС, как показано в настоящем исследовании, косвенно может свидетельствовать об участии каллозы в создании особых механических свойств ТКС волокна в норме и в ходе гравитовета, что нуждается в дальнейшем изучении и подтверждении.

При анализе *LusGSLs* все же необходимо отметить два гена, у которых было двукратное достоверное повышение экспрессии во всех временных точках при гравитовете: *Lus10032648* и *Lus10033689* (гомологичные *ATGSL5*) (рис. 36). Показано, что *ATGSL5* необходим в ответе на грибную инфекцию [25, 26]. Было продемонстрировано, что после заражения листьев *A. thaliana* мучнистой росой индуцированная патогеном каллозосинтаза *ATGSL5* высвобождалась из плазматической мембраны, где она локализовалась в необработанных клетках эпидермиса листьев, и реинтегрировалась в место попытки проникновения гриба для образования локальных каллозных пробок [25]. *ATGSL5* важен и для формирования экзины в КС пыльцевой трубки [27]. Недавно обнаружено, что *ATGSL5* изменяет проницаемость ПД [22]. В волокнах льна эти гены проявляли максимум экспрессии на стадиях интрузивного роста и начала формирования ТКС, многократно понижая экспрессию в зрелых волокнах и вновь увеличивая ее при гравитовете. Поскольку транскрипционные процессы предшествуют функциональному проявлению, по всей видимости, каллоза является необходимым компонентом КС флоэмных волокон льна, как минимум, на стадии формирования ТКС. В тоже время анализ экспрессии всех *LusGSLs* в волокнах льна выявил, главным образом, уменьшение экспрессии при гравитовете, которое наблюдали в основном у генов, для ближайших гомологов которых была показана вовлеченность в формирование пыльцы, пыльцевой трубки, каллозных пробок и в регуляцию ПД. Однако согласно функциональным характеристикам генов *GSL*, эти ферменты могут быть вовлечены в разные биологические процессы [10]. Поэтому говорить о роли обнаруженных дифференциально экспрессирующихся генов преждевременно. К тому же сообщалось, что ПД исчезали во флоэмных волокнах в начале интрузивного роста [16].

В ходе гравитовета выявлено повышение экспрессии генов предполагаемых β -1,3-глюканаз в волокнах льна. Известно, что помимо синтеза, пространственная и временная локализация каллозы контролируется ее селективной деградацией, которую осуществляют растительные β -1,3-глюканазы (*BG*), принадлежащие семейству *GH17*. Следует отметить, что аннотация и номенклатура *GH17* даже для *A. thaliana* намного слабее проработана и описана, чем номенклатура каллозосинтаз. Глюканазы могут быть обо-

значены в базах данных как *GLUCAN ENDO-1,3-BETA-GLUCOSIDASE* (что объединяет два типа активности — эндо- (*EC 3.2.1.39*) и экзо- (*EC 3.2.1.58*), хотя в некоторых случаях такое название используют как синоним глюканаз) или как β -1,3-*GLUCANASE* (рис. 5). При этом нумерация генов для этих номенклатур независима или отсутствует. Для многих представителей этого семейства активность вовсе не показана, и они обозначаются как *O-GLYCOSYL HYDROLASES FAMILY 17 PROTEIN*. Из 96 генов *GH17* для дальнейшего анализа был отобран 21 ген, экспрессия которых значительно отличалась от контроля (рис. 5). Информация по ближайшим гомологам высокоэкспрессируемых генов в волокнах на стадии интрузивного роста и начала формирования ТКС (1 и 2 группа) очень скудная. На основе данных о белок-белковых взаимодействиях и известных белках, ассоциированных с синтезом КС, было выдвинуто предположение, что *AT2G05790* (*Lus10015151*) связан с синтезом КС [28]. Возможно, продукт *Lus10015151* имеет отношение к контролю уровня каллозы в пределах КС. Однако есть данные об увеличении экспрессии *AT1G32860* (гомолог *Lus10033244* — гена группы также с максимумом на стадии интрузивного роста) при холодовом стрессе [29]. Показано также, что плазмодесмоспецифичная глюканаза *AtBG_PPAP* (*AT5G42100*) имеет наибольшую гомологию с *AT1G32860* (61% идентичности и 73% сходства) [30]. Дифференциальная экспрессия при стрессовых воздействиях (нагрев, солевой и осмотический стрессы) была показана для *AT2G01630* [31], ближайшего гомолога *Lus10034607* (гена этой же группы). Для *AT2G01630* предсказан и подтвержден *GPI* (гликозилфосфатидилинозитол)-якорь [32], что является необходимым условием в предсказании участия в регуляции плазмодесм путем разрушения каллозы [15]. Нужно отметить, что с помощью сервиса *NetGPI-1.1* мы тестировали гены на присутствие *GPI*-якоря (рис. 5). Из шести белков с предсказанным *GPI*-якорем (вероятность 0.173–0.503), четыре принадлежали группе белков, гены которых максимально экспрессировались в волокнах на стадии интрузивного роста, но активацию экспрессии которых также наблюдали и при гравистимуляции. На основании данных литературы о гомологичных генах этой группы, их продукты предположительно можно отнести к ферментам, вовлеченным в ростовые процессы (интрузивный рост) и в ответы на стрессовые воздействия. В четвертой группе генов (рис. 5), имеющих повышенный уровень экспрессии в волокнах с ТКС и понижение экспрессии при гравистимуляции, хочется отметить *Lus10025892* (*AT3G07320*). Показано, что экспрессия *AT3G07320* повышалась при сверхэкспрессии *ANAC012* — гена фактора транскрипции

из семейства NAC, вызывающего резкое подавление отложения вторичной КС [33]. Эти данные согласуются с нашими, согласно которым выявлена высокая экспрессия *Lus10025892* в волокнах, имеющих зрелую ТКС, которая формируется после отложения вторичной КС (рис. 5). Некоторые гены *BG* (3 группа, рис. 5) увеличивали экспрессию только в PUL-образцах по сравнению с ОРР (рис. 6). Для двух из них ближайшими гомологами были *ATBG1* и *ATBG3*. Продукты этих генов относят к PR-BG [34]. Это значит, что этот тип глюканаз накапливается в случае атаки патогена, разрушая их β -1,3-глюканы, и по своей доменной структуре их относят к пятой группе глюканаз, характеризующейся наличием сигнального пептида и отсутствием доменов СВМ (углевод-связывающего) и СТС (гидрофобной С-терминальной последовательности) [15]. Белковая последовательность *Lus10021088* также имеет аналогичную структуру (рис. 6), у нее имеется только сигнальный пептид и домен GH17. Белки семейства PR-BG или PR-2, регулируются стрессовыми условиями и являются частью врожденной иммунной системы растений, сильно индуцируемой во время инвазии патогена наряду с другими PR-генами. Регуляция биосинтеза и активности BG растений происходит на уровнях тканеспецифической экспрессии их генов и компарментализированного накопления. Следовательно, конкретная субклеточная локализация BG имеет решающее значение для его функционирования в различных клеточных процессах [34].

Таким образом, при гравистимуляции растений льна наблюдали уменьшение экспрессии генов ферментов биосинтеза и явное повышение экспрессии генов деградирующих ферментов. Точные механизмы вовлечения каллозы в реализацию гравитропической реакции еще предстоит выяснить. Наша гипотеза заключается в том, что каллоза, являясь структурным компонентом КС волокна, может хорошо удерживать воду и сдерживать “сокращение” (натяжение) волокна в ходе его развития, в том числе и при формировании ТКС. В связи с этим, при гравистимуляции появляется необходимость гидролиза этого полисахарида, чтобы снизить напряжение в КС. Это объясняет увеличение экспрессии генов BGs, особенно на верхней стороне стебля, которую мы называем тянущей, где предполагается “сокращение” волокон. При этом по длине волокна в некоторых местах могут образовываться (или оставаться) каллозные пробки, которые, в свою очередь, могли бы ограничивать пропускную способность важных соединений между возникшими септами. Учитывая, что волокна — очень длинные клетки, септирование с помощью каллозных пробок могло бы облегчить их функциональную (“мышечную”) активность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в данном исследовании в *Linum usitatissimum* были выявлены гены, кодирующие белки, потенциально участвующие в метаболизме каллозы: 28 генов, гомологичных генам каллозосинтаз (GSLs), и 96 генов, гомологичных генам гликозидгидролаз 17 семейства (GH17). Охарактеризован профиль экспрессии, главным образом, генов с высоким значением экспрессии либо проявляющих изменение экспрессии при гравистимуляции. В связи с тем, что в волокнах на стадии интрузивного роста и на ранней стадии формирования ТКС часто наблюдали максимумы экспрессии как для *GSLs*, так и для *GH17* можно предположить активный метаболизм каллозы в клеточной стенке волокна как на стадии его роста растяжением, так и на стадии утолщения клеточной стенки. Если при гравитропизме *GSLs* проявляли в основном понижение экспрессии, за исключением генов, гомологичных *ATGSL1*, *ATGSL4* и *ATGSL5*, то *GH17s* показывали весьма разнообразные профили экспрессии. Среди них выделены *BGs*, которые значительно повышали экспрессию только при гравитропизме (*LusBG1* и *LusBG3*), что предполагает активную деградацию каллозы в волокнах в ходе гравитропизма. К концу гравитропизма (через 96 ч) значения экспрессии анализируемых генов часто не просто достигали значений экспрессии в волокнах контрольных растений, а приближались к значениям более ранней стадии развития волокна.

Полученные данные могут быть использованы для исследования роли β -1,3-глюкансинтаз и β -1,3-глюканаз в растениях в норме и при гравитропизме. Но остаются вопросы о локализации каллозы и ее количественной оценке. Ответы на них предстоит получить в дальнейших исследованиях.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-24-00612.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mouliа В., Fournier M.* The power and control of gravitropic movements in plants: a biomechanical and systems biology view // *J. Exp. Bot.* 2009. V. 60. P. 461.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ern341>
2. *Gorshkova T., Chernova T., Mokshina N., Ageeva M., Mikshina P.* Plant “muscles”: fibers with a tertiary cell wall // *New Phytol.* 2018. V. 218. P. 66.
<https://doi.org/10.1111/nph.14997>

3. *Almeras T., Derycke M., Jaouen G., Beauchene J., Fournier M.* Functional diversity in gravitropic reaction among tropical seedlings in relation to ecological and developmental traits // *J. Exp. Bot.* 2009. V. 60. P. 4397.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erp276>
4. *Kojima M., Becker V.K., Altaner C.M.* An unusual form of reaction wood in Koromiko [*Hebe salicifolia* G. Forst. (Pennell)], a southern hemisphere angiosperm // *Planta.* 2012. V. 235. P. 289.
<https://doi.org/10.1007/s00425-011-1503-z>
5. *Fisher J.B.* Anatomy of axis contraction in seedlings from a fire prone habitat // *Am. J. Bot.* 2008. V. 95. P. 1337.
<https://doi.org/10.3732/ajb.0800083>
6. *Schreiber N., Gierlinger N., Putz N., Fratz P., Neinhuis C., Burgert I.* G-fibres in storage roots of *Trifolium pratense* (Fabaceae): tensile stress generators for contraction // *Plant J.* 2010. V. 61. P. 854.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04115.x>
7. *Ibragimova N.N., Ageeva M.V., Gorshkova T.A.* Development of gravitropic response: unusual behavior of flax phloem G-fibers // *Protoplasma.* 2017. V. 254. P. 749.
<https://doi.org/10.1007/s00709-016-0985-8>
8. *Waterkeyn L., Caeymaex S., Decamps E.* Callose in compression wood tracheids of *Pinus* and *Larix* // *Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.* 1982. V. 115. P. 149.
9. *Chen X.-Y., Kim J.-Y.* Callose synthesis in higher plants // *Plant Signal. Behav.* 2009. V. 4. P. 489.
<https://doi.org/10.4161/psb.4.6.8359>
10. *Usak D., Haluška S., Pleskot R.* Callose synthesis at the center point of plant development – an evolutionary insight // *Plant Physiol.* 2023. V. 193. P. 54.
<https://doi.org/10.1093/plphys/kiad274>
11. *Pirselova B., Matusikova I.* Callose: the plant cell wall polysaccharide with multiple biological functions // *Acta Physiol. Plant.* 2013. V. 35. P. 635.
<https://doi.org/10.1007/s11738-012-1103-y>
12. *Richmond T.A., Somerville C.R.* The cellulose synthase superfamily // *Plant Physiol.* 2000. V. 124. P. 495.
<https://doi.org/10.1104/pp.124.2.495>
13. *Verma D.P.S., Hong Z.* Plant callose synthase complexes // *Plant Mol. Biol.* 2001. V. 47. P. 693.
<https://doi.org/10.1023/A:1013679111111>
14. *Lombard V., Ramulu H.G., Drula E., Coutinho P.M., Henrissat B.* The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013 // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. P. D490.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>
15. *Perrot T., Pauly M., Ramírez V.* Emerging roles of β -glucanases in plant development and adaptative responses // *Plants.* 2022. V. 11. P. 1119.
<https://doi.org/10.3390/plants11091119>
16. *Snegireva A.V., Ageeva M.V., Amenitskii S.I., Chernova T.E., Ebskamp M., Gorshkova T.A.* Intrusive growth of sclerenchyma fibers // *Russ. J. Plant Physiol.* 2010. V. 57. P. 342.
<https://doi.org/10.1134/S1021443710030052>
17. *Gorshkova T., Chernova T., Mokshina N., Gorshkov V., Kozlova L., Gorshkov O.* Transcriptome analysis of intrusively growing flax fibers isolated by laser microdissection // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 14570.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-32869-2>
18. *Mokshina N., Gorshkov O., Takasaki H., Onodera H., Sakamoto S., Gorshkova T., Mitsuda N.* FIBexDB: a new online transcriptome platform to analyze development of plant cellulosic fibers // *New Phytol.* 2021. V. 231. P. 512.
<https://doi.org/10.1111/nph.17405>
19. *Cui W., Lee J.-Y.* Arabidopsis callose synthases CalS1/8 regulate plasmodesmal permeability during stress // *Nat. Plants.* 2016. V. 2. P. 16034.
<https://doi.org/10.1038/nplants.2016.34>
20. *Tee E.E., Johnstona M.G., Papp D., Faulkner C.A.* PDLN-NHL3 complex integrates plasmodesmal immune signaling cascades // *PNAS.* 2023. V. 120. e2216397120.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2216397120>
21. *Sevilem I., Miyashima S., Helariutta Y.* Cell-to-cell communication via plasmodesmata in vascular plants // *Cell Adh. Migr.* 2013. V. 7. P. 27.
<https://doi.org/10.4161/cam.22126>
22. *Saatian B., Kohalmi S.E., Cui Y.* Localization of *Arabidopsis* Glucan Synthase-Like 5, 8, and 12 to plasmodesmata and the GSL8-dependent role of PDLN5 in regulating plasmodesmal permeability // *Plant Signal. Behav.* 2023. V. 18. P. 2164670.
<https://doi.org/10.1080/15592324.2022.2164670>
23. *Xie B., Wang X., Zhu M., Zhang Z., Hong Z.* *Cals7* encodes a callose synthase responsible for callose deposition in the phloem: a phloem-specific callose synthase // *Plant J.* 2011. V. 65. P. 1.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04399>
24. *Gorshkov O., Mokshina N., Ibragimova N., Ageeva M., Gogoleva N., Gorshkova T.* Phloem fibres as motors of gravitropic behaviour of flax plants: level of transcriptome // *Funct. Plant Biol.* 2018. V. 45. P. 203.
<https://doi.org/10.1071/FP16348>
25. *Ellinger D., Naumann M., Falter C., Zwikowics C., Jamrow T., Manisseri C., Somerville S.C., Voigt C.A.* Elevated early callose deposition results in complete penetration resistance to powdery mildew in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2013. V. 161. P. 1433.
<https://doi.org/10.1104/pp.112.211011>
26. *Naumann M., Somerville S., Voigt C.* Differences in early callose deposition during adapted and non-adapted powdery mildew infection of resistant *Arabidopsis* lines // *Plant Signal. Behav.* 2013. V. 8. e24408.
<https://doi.org/10.4161/psb.24408>
27. *Enns L.C., Kanaoka M.M., Torii K.U., Comai L., Okada K., Cleland R.E.* Two callose synthases, GSL1 and GSL5, play an essential and redundant role in plant and pollen development and in fertility // *Plant Mol. Biol.* 2005. V. 58. P. 333.
<https://doi.org/10.1007/s11103-005-4526-7>
28. *Zhou C., Yin Y., Dam P., Xu Y.* Identification of novel proteins involved in plant cell-wall synthesis based on protein-protein interaction data // *J. Proteome Res.*

2010. V. 9. P. 5025.
<https://doi.org/10.1021/pr100249c>
29. Sakuma Y., Maruyama K., Osakabe Y., Qin F., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression // *Plant Cell*. 2006. V. 18. P. 1292.
<https://doi.org/10.1105/tpc.105.035881>
30. Levy A., Erlanger M., Rosenthal M., Epel B.L. A plasmodesmata-associated beta-1,3-glucanase in Arabidopsis // *Plant J*. 2007. V. 49. P. 669.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02986.x>
31. Ho L.H., Giraud E., Uggalla V., Lister R., Clifton R., Glen A., Thirkettle-Watts D., Van Aken O., Whelan J. Identification of regulatory pathways controlling gene expression of stress-responsive mitochondrial proteins in Arabidopsis // *Plant Physiol*. 2008. V. 147. P. 1858.
<https://doi.org/10.1104/pp.108.121384>
32. Borner G.H., Lilley K.S., Stevens T.J., Dupree P. Identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in Arabidopsis. A proteomic and genomic analysis // *Plant Physiol*. 2003. V. 132. P. 568.
<https://doi.org/10.1104/pp.103.021170>
33. Ko J.H., Yang S.H., Park A.H., Lerouxel O., Han K.H. ANAC012, a member of the plant-specific NAC transcription factor family, negatively regulates xylary fiber development in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J*. 2007. V. 50. P. 1035.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03109.x>
34. Zavaliev R., Levy A., Gera A., Epel B.L. Subcellular dynamics and role of Arabidopsis β -1,3-glucanases in cell-to-cell movement of tobamoviruses // *Mol. Plant Microbe Interact*. 2013. V. 26. P. 1016.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-03-13-0062-R>