



УДК 581.1

Кальций в растительных клетках

В.В. Швартау¹, П.А. Вирыч¹, Т.И. Маковейчук¹, А.Ю. Артеменко²

¹Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Київ, Україна

²УНЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Представлены данные о роли кальция в растительных организмах. Описано участие элемента в процессах размножения, роста и развития, поглощения и транспорта веществ, реакции на неблагоприятные факторы окружающей среды, в защитных реакциях на повреждения патогенами и в симбиотических взаимодействиях. Рассмотрены молекулярные и биофизические механизмы транспорта Ca^{2+} , его участие в сигнальных системах, регуляции концентрации в компартментах клетки. Рассмотрены основные механизмы моделирования поведения кальциевой сигнальной системы в зависимости от типа фактора влияния и возможные модификации ответа путем влияния на ключевые компоненты системы.

Ключевые слова: кальций; растения; сигнальная система; гомеостаз

Calcium in plant cells

V.V. Schwartau¹, P.A. Virych¹, T.I. Makoveychuk¹, A.Y. Artemenko²

¹Institute of Plant Physiology and Genetics of NAS of Ukraine, Kiev, Ukraine

²ESC "Institute of Biology" of Taras Shevchenko Kyiv National University, Kiev, Ukraine

The paper gives the review on the role of calcium in many physiological processes of plant organisms, including growth and development, protection from pathogenic influences, response to changing environmental factors, and many other aspects of plant physiology. Initial intake of calcium ions is carried out by Ca^{2+} -channels of plasma membrane and they are further transported by the xylem owing to auxins' attractive ability. The level of intake and selectivity of calcium transport to above-ground parts of the plant is controlled by a symplast. Ca^{2+} enters to the cytoplasm of endoderm cells through calcium channels on the cortical side of Caspary bands, and is redistributed inside the stele by the symplast, with the use of Ca^{2+} -ATPases and Ca^{2+}/H^+ -antiports. Owing to regulated expression and activity of these calcium transporters, calcium can be selectively delivered to the xylem. Important role in supporting calcium homeostasis is given to the vacuole which is the largest depo of calcium. Regulated quantity of calcium movement through the tonoplast is provided by a number of potential-, ligand-gated active transporters and channels, like Ca^{2+} -ATPase and Ca^{2+}/H^+ exchanger. They are actively involved in the inactivation of the calcium signal by pumping Ca^{2+} to the depo of cells. Calcium ATPases are high affinity pumps that efficiently transfer calcium ions against the concentration gradient in their presence in the solution in nanomolar concentrations. Calcium exchangers are low affinity, high capacity Ca^{2+} transporters that are effectively transporting calcium after raising its concentration in the cell cytosol through the use of protons gradients. Maintaining constant concentration and participation in the response to stimuli of different types also involves ER, plastids, mitochondria, and cell wall. Calcium binding proteins contain several conserved sequences that provide sensitivity to changes in the concentration of Ca^{2+} and when you connect ion conformationally rearranged, thus passing the signal through the chain of intermediaries. The most important function of calcium is its participation in many cell signaling pathways. Channels, pumps, gene expression, synthesis of alkaloids, protective molecules, NO etc. respond to changes in $[Ca^{2+}]_{cyt}$, while transducers are represented by a number of proteins. The universality of calcium is evident in the study in connection with other signaling systems, such as NO, which is involved in the immune response and is able to control the feedback activity of protein activators channels, producing nitric oxide. Simulation of calcium responses can determine the impact of key

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, ул. Васильківська, 31/17, Київ, 03022, Україна.

Institute of Plant Physiology and Genetics NAS of Ukraine, Vasylykivska str., 31/17, Kiev, 03022, Ukraine.

Tel.: +38-044-257-90-18. E-mail: schwartau@ifrg.kiev.ua, sphaenodon@ukr.net, makoveyt@ukr.net

УНЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка,

пр. Академіка Глушкова, 2, Київ, 03022, Україна.

TRC «Institute of Biology» Taras Shevchenko Kiev National University, Akademik Glushkov Ave., 2, Kiev, 03022, Ukraine.

Tel.: +38-066-429-65-25. E-mail: artemenko_alex@ukr.net

level and their regulation, and also depends on the type of stimulus and the effector protein that specifically causes certain changes. Using spatiotemporal modeling, scientists showed that the key components for the formation of Ca^{2+} bursts are the internal and external surfaces of the nucleus membrane. The research was aimed at understanding of the mechanisms of influence of Ca^{2+} -binding components on Ca^{2+} oscillations. The simulation suggests the existence of a calcium depot EPR with conjugated lumen of the nucleus which releases its contents to nucleoplasm. With these assumptions, the mathematical model was created and confirmed experimentally. It describes the oscillation of nuclear calcium in root hairs of *Medicago truncatula* at symbiotic relationship of plants and fungi (rhizobia). Calcium oscillations are present in symbiotic relationships of the cortical layer of plant root cells. Before penetration of bacteria into the cells, slow oscillations of Ca^{2+} are observed, but with their penetration into the cells the oscillation frequency increases. These processes take place by changing buffer characteristics of the cytoplasm caused by signals from microbes, such as Nod-factor available after penetration of bacteria through the cell wall. Thus, the basic known molecular mechanisms for regulation of calcium homeostasis in plant cells are reviewed. Data presented in the paper is important for understanding the role of calcium in the ions' homeostasis and can be used for developing high-performance technologies of crops nutrition.

Keywords: calcium; plants; signal system; homeostasis

Введение

Сегодня никто не сомневается в том, что ионы кальция участвуют во многих физиологических процессах растительного организма. Среди них регуляция роста и развития, защита от патогенных влияний, восприятие изменений физических и химических факторов окружающей среды и многих других аспектов физиологии растений. Передача информации внутри клетки осуществляется веществами, количество которых можно легко регулировать и получать из внешней среды путем использования транспортных систем плазматической мембраны. Система регуляции внутриклеточной концентрации должна быть четко слажена для обеспечения быстрой десинситизации и подготовки к новому восприятию. Среди неорганических ионов существует несколько кандидатов: калий, натрий, кальций и магний. Первые два имеют сложные гидратные оболочки с большим диаметром и единичный заряд, что затрудняет взаимодействие с белковыми молекулами и прочное связывание с ними. Кальций способен образовывать от 6 до 9 координационных связей с лигандами, магний – строго 6, при этом часть связей используется на присоединение воды, что уменьшает его сродство к белковым молекулам. Еще одной проблемой является фиксированная длина связи в молекуле MgO – 0,21 нм, у кальция она более лабильна (0,23–0,26 нм), что позволяет ему образовывать координационные связи в белковом окружении быстрее и также быстро замещаться (приблизительно в 1000 раз по сравнению с магнием). Важным вопросом является поддержание гомеостаза иона. На поддержание постоянной концентрации ионов калия и натрия по обе стороны плазмалеммы клетка использует около 30% своей энергии, а на гомеостаз кальция – лишь около 1%.

Поступление кальция в растение осуществляется в ионной форме через кончик корня, что не очень эффективно по сравнению с другими ионами, например калием, который поглощается всей поверхностью. Также процессы поступления зависят от многих внешних условий, в т.ч. влажности почвы, количества кислорода, кислотности. Примером могут служить исследования на томатах, которые проявляли признаки дефицита кальция при нормальном его количестве в почве и водном стрессе. Первичное поглощение осуществляется Ca^{2+} -проводимыми каналами плазматической мембраны, а дальнейший транспорт осуществляется ксилемой за счет атрагирующей способности ауксинов. Внутри ткани, между клетками, кальций движется как апопластно, так

и симпластно. При апопластном – Ca^{2+} поступает к ксилеме, не изменяя внутриклеточного количества. Этот путь транспорта сильно влияет на транспирацию, что может привести к чрезмерному его притоку к наземной части растения и развитию кальцийиндуцированных болезней. Кроме того, апопластный транспорт неселективен к двухвалентным катионам, что может привести к аккумуляции токсических веществ (White et al., 2000). Симпластный путь позволяет растению контролировать уровень и селективность транспорта кальция к наземной части растения. Ca^{2+} поступает в цитоплазму клеток эндодермы через кальциевые каналы на кортикальной стороне поясков Каспари и перераспределяется внутри стелы по симпласту с помощью Ca^{2+} -АТФаз и Ca^{2+}/H^+ -антипортов. Благодаря регулируемой экспрессии и активности этих транспортеров кальций может селективно доставляться к ксилеме в необходимых количествах (Medvedev, 2005). Эти перемещения должны быть строго сбалансированы, так как изменения концентрации кальция внутри клетки могут привести к нарушениям гомеостаза и возможному апоптозу. К этим изменениям также относится контроль поглощения и накопления токсичных ионов (Al , Cu) в наземной части растения. Для поддержания нормального роста и развития растения уровень поглощения должен находиться в пределах 1–10 мкМ. В отличие от одновалентных катионов, кальций не способен к реутилизации и накапливается в старых частях растения. Передвижение по растению осуществляется ситовидными трубками со скоростью приблизительно 1 м/час.

В цитоплазме концентрация кальция на 3–4 порядка ниже, чем во внутриклеточных компартментах. В состоянии покоя она варьирует в пределах 100–200 нМ, в митохондриях и ЭПР – около 1 мМ, в клеточной стенке и вакуоли – 1–10 мМ.

Множество белковых молекул способны изменять свою активность при связывании ионов Ca^{2+} , но в при-соединении участвуют лишь несколько аминокислотных последовательностей.

C_2 -домен содержит около 130 аминокислотных остатков и первоначально идентифицирован в Ca^{2+} -зависимой протеинкиназе C . Он имеет два типа строения в зависимости от направления первой и последней β -складки, но общий принцип похож. Домен составляют 8 антипараллельных β -структур, которые образуют четыре β -слоя. Связывание иона кальция происходит в неупорядоченной части молекулы, между 2–3 и 6–7 β -складками. Кальцийсвязывающие белки могут содержать один или два домена C_2 . Большинство из них свя-

заны с мембранами, где и выполняют свои функции путем расщепления липидов (фосфолипаза A_2 , D , C), белок-белковых взаимодействий (протеинкиназа C), регуляции везикулярного транспорта (перфорин, синапто-тагмин, рабфидин), участвуют в ГТФазных сигнальных путях (Nalefski and Falke, 1996).

EF -домен имеет структуру типа «спираль – петля – спираль» (helix – loop – helix) и состоит лишь из 29 аминокислотных остатков. Спираль E включает первые 10, петля – 10–21, а F -спираль – аминокислоты 19–29. Связывание кальция происходит в области петель координационными связями с аспаратом и глутаматом. Каждый такой домен способен присоединить два иона кальция и входит в состав множества белков: кальмодулина, кальцийзависимых протеинкиназ, центрина, кальцинейрина, B -подобных белков, фосфолипаз, каналов, белковых фосфатаз и многих других (Day et al., 2002).

Кальциевые транспортеры

Существует несколько типов кальциевых транспортеров в зависимости от локализации и типа регуляции.

В плазматической мембране (ПМ) присутствует семейство кальциевых каналов, которые активируются в ответ на деполяризацию. Они были идентифицированы в клетках корней, мезофила листа и в суспензионных культурах. Эти каналы чувствительны к верапамилу, ионам лантана и гадолиния. Среди них есть высоко- и низкоселективные, которые кроме кальция способны пропускать также магний, барий, стронций.

Также в ПМ находятся гиперполяризационные Ca^{2+} -каналы, присутствующие в самых разнообразных тканях растения и выполняющие различные функции, включающие механочувствительность (эпидермис), закрывание – открывание устьичного аппарата, поглощение ионов из почвенного раствора, защиту от патогенных влияний, передачу сигнала от абсцизовой кислоты (АБК).

В ранних исследованиях элиситор-активированные Ca^{2+} -каналы ПМ описаны в клетках томата (*Lycopersicon esculentum* L.) и петрушки (*Petroselinum crispum* (Mill.) A.W. Hill.). Они активируются при низких значениях мембранного потенциала (около $-120 \dots -150$ мВ) и имеют высокую проницаемость (186 пС при 5 мМ внеклеточной концентрации $CaCl_2$ в суспензионной культуре клеток *P. crispum*). Ингибируются они микромолярными концентрациями La^{3+} и нифедипином. Исследования влияния различных элиситоров выделили типы кальциевых ответов. Клетки табака обрабатывали криптогенином и олигогалактоуридами. В обоих случаях наблюдался кальциевый ответ, затрагивающий цитозоль, митохондрии и хлоропласты; индуцировалось возрастание количества цитозольного кальция, транзистентные токи митохондрий. При этом ответ хлоропластов был несколько замедлен. При воздействии олигогалактоуридов не наблюдается значительного возрастания $[Ca^{2+}]_{цит}$ в отличие от криптохромов, что демонстрируют длительные высокоамплитудные возрастания $[Ca^{2+}]_{цит}$. Это позволяет разделить внутриклеточные пути сигнализации при влиянии этих двух веществ, которые включают и IP_3 (Manzoor et al., 2012).

Важную роль в поддержании кальциевого гомеостаза играет вакуоль. Она может занимать около 90% всего объема клетки и служит наибольшим депо кальция. При этом наблюдается значительный электрохимический градиент Ca^{2+} на тонопласте с большой разницей в концентрациях $[Ca^{2+}]_{цит} - 100-500$ нМ и $[Ca^{2+}]_{вак} -$ до 1 мМ.

Среди обнаруженных каналов тонопласта есть как потенциал-, так и лигандуправляемые. Они отвечают на действие фитата, кальция, IP_3 , АДФ-рибозы. При этом их разделяют на медленные и быстрые. Эти каналы ингибируются верапамилом, ионами лантана, наномолярными концентрациями карибдотоксина в цитоплазме, микромолярными – квинакрином, квинином, 9-аминоакридином, тубокурарином.

Наиболее важные из них те, которые принимают участие в поддержании гомеостаза кальция в цитоплазме – Ca^{2+} -АТФазы и Ca^{2+}/H^+ -обменники.

Кальциевые АТФазы – высокоаффинные насосы, которые эффективно переносят ионы кальция против градиента в присутствии их в растворе в наномолярных концентрациях. Они являются членами суперсемейства P -типа АТФаз, которые характеризуются формированием промежуточных фосфорилированных состояний в их каталитическом цикле (Brini and Crafoli, 2009). Был идентифицирован ряд генов, которые отвечают за синтез этих транспортеров у растений и низших грибов. Дрожжи и растительные клетки содержат разные Ca^{2+} -АТФазы, которые похожи на животные типы. Вакуолярные транспортеры принадлежат к подтипу ПВ Ca^{2+} -АТФаз и похожи последовательностями и кинетикой на животные кальциевые АТФазы плазматической мембраны.

Для лучшего понимания связывания АТФ и механизмов активности Ca^{2+} -АТФаз проведена изоляция их АТФ-связывающих доменов *Solanum lycopersicon* типа ПА, которая не регулируется кальмодулином (принадлежит к P -типу) и гомологически очень похожа на найденную у млекопитающих ЭПР Ca^{2+} -АТФазу (SERCA) и *Arabidopsis Ca^{2+}*-АТФазу, изоформы 2, типа ПВ кальмодулинрегулируемую помпу P -типа эндоплазматического ретикула клеток *Arabidopsis*. Для исследований использовали флуоресцентные метки, связывающиеся с АТФ-гидролизными сайтами обеих Ca^{2+} -АТФаз. Интересным оказался тот факт, что растительные насосы могут с низким сродством связывать ГТФ, в отличие от SERCA и PMCA типов насосов млекопитающих, которые не способны этого делать (Galva et al., 2013).

В отличие от Ca^{2+} -АТФаз, кальциевые обменники – низкоаффинные высокоемкостные Ca^{2+} транспортеры, которые эффективно транспортируют кальций после поднятия его концентрации в цитозоле клетки. В обменном процессе может участвовать ион натрия или протон, соответственное название каналов – Na^+/Ca^{2+} - или Ca^{2+}/H^+ -обменники. При транспортировке одного иона кальция используется 2–3 протона. Повышение кислотности вакуолей растений протонной помпой генерирует большой протонный градиент на тонопласте, что используется для переноса кальция. Эти протонные АТФазы принадлежат к V -типу ($V-H^+$ -АТФаза), также растительная вакуоль имеет H^+ -пирофосфатазу. Активность этих насосов критично влияет на Ca^{2+}/H^+ -

обменную способность тонопласта, что продемонстрировано во многих исследованиях (Krebs et al., 2010).

Гены, отвечающие за кодирование кальций-протонного обменника (САХ) идентифицированы в *Arabidopsis*. Через некоторое время они были найдены в рисе и сое. САХ2, САХ5 и САХ6 типа 1В имеют более широкую субстратную специфичность к двухвалентным катионам, таким как Mn^{2+} и Cd^{2+} , в дополнение к Ca^{2+} (Hirschi et al., 2000; Pittman et al., 2004; Edmond et al., 2009) транспортёры САХ1, САХ3 и САХ4 типа 1А высокоспецифичны к транспортировке кальция (Shigaki et al., 2003). Регуляция активности осуществляется посттрансляционными модификациями N-конца, куда прикрепляется регуляторный протеин. Также наблюдается смена активности при взаимодействиях типа «протеин – протеин» с формированием гетерокомплексов между САХ1 и САХ3 (Zhao et al., 2009a, 2009b; Pittman, 2011).

Некоторые ионные проводимости в вакуолярной мембране регулируются уровнем $[Ca^{2+}]_{цит}$, и белки, отвечающие за это, содержат связывающие кальций домены. Они включают в себя канал SV (Slow Vacuolar Channel), кодируемый TPC1. По крайней мере, еще два канала идентифицированы в тонопласте: вакуолярный калиевый канал (VK) и быстрый вакуолярный канал (FV) (Ward and Schroeder, 1994; Tikhonova et al., 1997). Активность VK канала зависит от $[Ca^{2+}]_{цит}$ в микромолярном диапазоне. Гены, отвечающие за кодирование этого канала – TWO-PORE K channel 1 (TPK1), они идентифицированы в *Arabidopsis thaliana* и *Nicotiana tabacum* (Gobert et al., 2007; Hamamoto et al., 2008). Белок TPK1 содержит два EF-домена, что объясняет его кальциевую зависимость при освобождении K^+ из вакуоли в клетках устьиц и при прорастании семян (Gobert et al., 2007; Reiter, 2011). Моделирование структуры TPC1 показало возможные сайты связывания Ca^{2+} , которые образованы остатками Glu-450, Asp-454, Glu-456 и Glu-457 на внутренней стороне канала. При замене одного из них функция канала теряется (Dadacz-Narloch et al., 2011).

ЭПР играет важную роль в поддержании постоянной концентрации цитозольного кальция и стабильной работы кальциевой сигнальной системы. Каналы активируются в ответ на аппликацию циклической АДФ-рибозы, никотиновой кислоты АТФ и IP_3 . Они довольно селективные, чувствительны к разнице концентраций Ca^{2+} на мембране ЭПР. Их проводность составляет 29 и 24 пкС в 50 мМ $CaCl_2$. Верапамил способен блокировать высокопроводящий канал, но на низкопроводящий не оказывает никакого влияния. Также он уменьшает проводимость при наличии в среде микромолярных концентраций Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} и наличии H_2O_2 .

Ключевую роль в регуляции внутриклеточных процессов, экспрессии генов, трансдукции сигналов играют циклические нуклеотиды цАМФ и цГМФ. Они могут связываться с двумя функциональными доменами белков – GAF (cyclic GMP, adenylyl cyclase, FhlA) и CNB (cyclic nucleotide binding). Фоторецепторы и рецепторы этилена содержат GAF-домен, но еще не было продемонстрировано непосредственного связывания ими циклических нуклеотидов. CNB-домен присутствует в двух группах катион-проницаемых каналов растений: циклические нуклеотидзависимые ионные каналы (CNGCs) и калиевые каналы шейкер-типа, для которых непосред-

ственное связывание циклических нуклеотидов не доказано. Первые – менее селективные и могут пропускать в основном Na^+ , K^+ и некоторые двухвалентные катионы, такие как Ca^{2+} .

Впервые был идентифицирован CNGC18 как катионный канал, активность которого зависит от циклических нуклеотидов и избыточная экспрессия которого приводила к аномальному росту пыльцевой трубки, в то время как с потерей функции наблюдалась мужская стерильность.

У *Arabidopsis* семейство CNGCs имеет около 20 членов, разделённых на 5 подсемейств (I, II, III, IVa и IVb) (Wu et al., 2011). В дополнение к CNGC18 есть еще 5 (7, 8, 9, 10 и 16), которые могут иметь отношение к ионным токам в пыльце. Активация происходит при связывании цАМФ на C-конце, а возможно также и при гиперполяризации. Негативная регуляция осуществляется кальмодулином при увеличении $[Ca^{2+}]_{цит}$ в том же сайте что и цАМФ так, что происходит конкуренция между этими двумя веществами, обеспечивая положительную и отрицательную регуляцию CNGC каналов. Они участвуют в выполнении множества функций: от регуляции роста пыльцевой трубки до адаптаций к биотическим и абиотическим стрессам (Nakagawa et al., 2007; Ma et al., 2009). Канал состоит из четырех субъединиц, которые формируют центральную неселективную пору, в области которой связываются циклические нуклеотиды. Каждая субъединица имеет шесть трансмембранных α -спиралей, C- и N-концы которых находятся в цитозоле. Порообразующая P-петля расположена между пятым и шестым трансмембранными доменами и включает саму пору и селективный фильтр. Внутри большого C-конца молекулы находится сайт связывания с кальмодулином, который перекрывается с CNB-доменом. Такое положение отличается от гомологичных каналов животных, где кальмодулиновая регуляция происходит в N-концевой части белка (Bradley et al., 2005).

К физиологическим функциям, которые выполняют эти каналы, принадлежит направленный рост пыльцевой трубки, что было доказано исследованиями экспрессии генов *Arabidopsis* и формированием этими каналами поляризационного градиента кальция для целенаправленного роста. Также они участвуют в транспорте двухвалентных ионов тяжёлых металлов и апоптозе.

Патогенное влияние также затрагивает активность генов, отвечающих за синтез этих каналов. Наблюдаемый эффект включает синтез NO, салициловой кислоты и ряда генов защиты.

Гомологи глутаматных рецепторов (Glutamate receptor homologs, GLRs)

У животных большинство ионотропных глутаматных рецепторов – лигандзависимые неселективные катионные каналы, которые пропускают Ca^{2+} и играют важную роль в передаче нервных импульсов и других клеточных процессов. Базируясь на их последовательностях и структуре, были идентифицированы гомологи глутаматных рецепторов у нескольких видов одно- и двудольных растений. Они имеют три трансмембранных домена: порообразующий и два лигандсвязывающих.

Гены, отвечающие за их кодирование, найдены в *Arabidopsis* в количестве 20 гомологов, риса – 30, тополя – 61. Наиболее высокая их экспрессия наблюдается в корнях, где происходит активное поглощение ионов (GLR1.1, GLR2.1, GLR3.1), клетках устьиц, цветов, стручков, сосудистых тканях (GLR3.1). GLR3.1 – высокоактивный в сосудах, тогда как GLR3.2 – в корнях, сосудистых пучках, клетках мезофилла, устьиц и способен реагировать на температурный стресс. GLR1.2 и GLR3.7 экспрессируются в пыльцевых трубках. Используя блокатор 6,7-динитроквиноксалин-2,3-дион, наблюдают ухудшение ингибирования роста светом и снижение светозависимого синтеза хлорофилла. Кроме того, агонист S(+)-бетаметилалфа,бета-диаминопропионовая кислота способствует элонгации гипокотилей *Arabidopsis* и ингибирует раскрытие семядолей под действием света. Интересно, что канамицин выступает в роли антагониста и снижает диэтиоляцию у мутантных растений *Arabidopsis*. Кроме того, антагонисты животных iGluR ингибируют продукцию Ca^{2+} и NO в ответ на индуцирование возбудителем притока элиситора криптогина, что подтверждает роль GLRs в передаче защитных сигналов у растений. Использованы генетические подходы к изучению физиологических функций GLRs. Семена ячменя с антисмысловым AtGLR1.1, едва проросшие в среде глюкозы, полностью восстанавливали свою жизнеспособность при добавлении в среду нитратов, что позволяет предположить контроль этим белком баланса углерода и азота (Kang and Turano, 2003). У такого рода растений наблюдаются сходные симптомы с гиперчувствительностью к абсцизовой кислоте, такие как редукция размеров устьичного аппарата и обратная регуляция 2C типа фосфатаз ABI1 и ABI2 (Kang et al., 2004). У риса, мутантного по гену OsGLR3.1, наблюдаются нарушения активности корневых меристем и запрограммированной гибели клеток (Li et al., 2006).

Этот тип каналов играет важную роль в Ca^{2+} гомеостазе и сигнализации. Гиперэкспрессия GLR3.2 в *Arabidopsis* обуславливает развитие симптомов дефицита кальция при его аккумуляции в растении, а AtGLR3.2 – гиперчувствительности к натрию и калию. GLR3.1 играет важную роль в индукции осцилляций Ca^{2+} в клетках устьиц и, собственно, кальциевой сигнализации (Jammes et al., 2011).

Двупоровые каналы (Two-pore channel 1, TPC1)

Гены двупорового канала 1 у *Arabidopsis* кодируют Ca^{2+} -индуцированные Ca^{2+} -освобождаемые каналы тонопласта. Они принадлежат к семейству потенциалзависимых катионных каналов и являются гомодимерами, каждый из которых имеет шесть трансмембранных спиралей и один порообразующий домен. Цитоплазматическая петля содержит две Ca^{2+} -связывающих EF-последовательности, что позволяет осуществлять Ca^{2+} -зависимую регуляцию белка. Предположительно, он должен был находиться в плазматической мембране, но был идентифицирован как медленный вакуолярный канал тонопласта в *Arabidopsis*. Активируется сменой потенциала тонопласта и поднятием концентрации внутриклеточного кальция (Peiter, 2005). У мутантных растений

tpc1, не имеющих функционального канала SV, наблюдаются дефекты на АБК-индуцированную репрессию прорастания семян и устьичные ответы на внеклеточный кальций (Peiter et al., 2005). NtTPC1s (*Nicotiana tabacum* TPC1s) были описаны как пути входа Ca^{2+} сквозь клеточную мембрану в клетках табака в ответ на холодовой шок, сахарозу, H_2O_2 , салициловую кислоту, которые действуют как элиситоры. OsTPC1, возможно, ключевой регулятор элиситор-активированного ответа, TaTPC1 – ответ на абиотический стресс.

Роль канала SV TPC1 в вакуолярном высвобождении кальция еще исследуется, и потому что канал не селективный относительно одно- и двухвалентных катионов, его функции могут касаться поддержания тургора, катионного гомеостаза, Ca^{2+} -зависимой передачи сигналов. Баланс между участием в разнообразных функциях зависит от влияния внешних факторов на клетку.

Механочувствительные кальцийпроницаемые каналы (Mechanosensitive Ca^{2+} -permeable channels, MSCCs)

Способность растений отвечать и адаптироваться ко многим механическим стимулам, таким как ветер, препятствия в почве и даже охотиться, в случае венериной мухоловки (*Dionaea muscipula*), предполагает участие ионов кальция в сигнальных процессах механочувствительности. Экспериментальные данные, доказывающие это, получены на проростках экворинэкспрессированного табака (Knight et al., 1991). Несколько позже Динг и Пикард описали наличие механочувствительных Ca^{2+} -чувствительных катионных каналов в эпидермальных клетках, в затененной цитоплазме которых наблюдалось повышение концентрации Ca^{2+} как доказательство активности каналов. Результаты петч-клемп-исследований одиночных клеток показали Ca^{2+} -активность каналов в плазматической мембране, зависящую от механических стимулов (Ding and Pichard, 1993). Gd^{3+} , La^{3+} и очень низкая температура замедляют каналы, тогда как этил-TV-фенилкарбамат, низкая температура, повышение pH и мембранная деполяризация сенсibiliзируют их.

В *Arabidopsis* найдена группа белков, похожих на бактериальные MscS (Mechanosensitive ion channel), ионные токи сквозь них зависели от механического влияния. Эти белки участвуют в корневой механочувствительности и управлении формой пластид. Также у ДНК *Arabidopsis* нашли потенциальный механочувствительный Ca^{2+} -канал, похожий на гомологичный дрожжей – MCA1 (mid1-complementing activity 1). Он располагался в плазматической мембране и, при чрезмерной экспрессии, повышал уровень цитозольного кальция; неспецифически блокировался гадолинием, но не реагировал на верапамил, что доказывало его принадлежность к семейству MSCC (Nakagawa et al., 2007).

Кальциевая сигнализация

Важнейшей функцией кальция является его участие во множестве сигнальных путей клетки. На изменения $[Ca^{2+}]_{цит}$ реагируют каналы, помпы, экспрессия генов,

синтез алкалоидов, защитных молекул, *NO* и др., а трансдукторами при этом является ряд белков (Medvedev, 2005). Рассмотрим основные из них.

Большинство белков CBL присутствуют в мембранах. Их эффекторные киназы главным образом локализируются в цитозоле и ядре (Batistic et al., 2010). Для исследований данных взаимодействий используют флуоресцентные метки и модифицированные ими эффекторные белки. С их помощью установлено место передачи кальциевого сигнала для разных протеинкиназ. Например, киназы CIPK23 и CIPK24 взаимодействуют с CBL1 и CBL9 возле плазматической мембраны (Xu, 2006; Waadt et al., 2008). Эти результаты позволяют установить, что белки CBL определяют местонахождение и действие комплексных соединений CBL-CIPK. Особый случай взаимодействия наблюдался для цитозольного датчика кальция CBL8 с киназой CIPK14. Взаимодействие между этими двумя белками наблюдалось исключительно в плазматической мембране (Batistic et al., 2010). Предположение, что CBL8 не имеет модифицированного липидом *N*-конца и, таким образом, отличается от липидмодифицированных CBL1, 4, 5 и 9, позволяет предположить альтернативный способ формирования комплексов CBL8-CIPK. Другие CIPK14-киназы взаимодействуют с локализованными в тонопласте CBL2 и CBL3, показывая, что одна и та же киназа может быть задействована в разных путях, с включением многообразных CBLs различных структур клетки. Дальнейшие исследования с помощью метода бимолекулярной флуоресцентной комплементации (Bimolecular fluorescence complementation, BiFC) обнаружили альтернативные пути взаимодействия и формирования комплексов CBL-CIPK24 в плазматической мембране – CBL1-CIPK24 и CBL5-CIPK24, тонопласте – CBL2-CIPK24 и CBL10-CIPK24 (Waadt et al., 2008; Batistic et al., 2010). Но данный метод не позволяет исследовать перемещение белков в клетке, так как дополнительно стабилизирует образованные ими комплексы, поэтому был использован иной подход к проблеме – коэкспрессия флуорофор-меченых CBLs и CIPKs. Эти исследования показали, что CIPK5, связанный с зеленым флуоресцентным белком (Green fluorescent protein, GFP), не находится в цитозоле долгое время и обнаруживается в тонопласте. Таким образом можно сделать вывод, что белки CBL, взаимодействуя в цитозоле с CIPKs, могут перемещаться к мембранам, где и выполняют основную функцию. Это должно в будущем связать зависимость альтернативных взаимодействий CBL-CIPK и концентрации Ca^{2+} в цитозоле. Вероятно, различные комплексы CBL-CIPK требуют формирования разных концентраций цитозольного кальция и эта зависимость касается расшифровки определенного Ca^{2+} -сигнала. Кроме того, Ca^{2+} -связывающие способности белков CBL могут изменяться при взаимодействии с другим CIPK, как это показали исследования кристаллизации комплексных соединений CBL2-CIPK14, так же как CBL4-CIPK24 (Sanchez-Barrena et al., 2013). Это создает дополнительные трудности в изучении зависимости концентрации Ca^{2+} и комплексообразования CBL-CIPK. Вместе взятые эти переменные параметры образования CBL-CIPK способствуют расшифровке отличающегося Ca^{2+} -сигнала в определенных мес-

тах клетки, запускающей генерацию отдельных специфических реакций.

Одна из важнейших функций данных взаимодействий – ответы на абиотический стресс с участием АБК у *Arabidopsis*. Недавними исследованиями проанализированы функции CBL и CIPK у пшеницы, сорго, яблони, хлопка, тополя и др. (Yang, 2008; Piao et al., 2010; Chen et al., 2012; Wang et al., 2012; He et al., 2013; Zhang et al., 2013). В последнее время пять новых CIPKs и два CBLs идентифицированы в фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.), 43 подобных CIPK гена (похожие у риса) обнаружены у кукурузы (*Zea mays* L.) (Hen et al., 2011). Функции CIPK риса заключаются в модуляции ответов на абиотический стресс на протяжении прорастания семян и роста проростков (OsCIPK31) (Piao et al., 2010) и ген OsCIPK23, который, как оказалось, мультистрессиндуцирован, регулирует сигнальные пути во время опыления и реакцию на водный дефицит (Yang et al., 2008). Другой пример – многофункциональность CIPK-OsCIPK15, который был включен в механизм толерантности к дефициту кислорода, а также в различных MAMP-иммунных (Microbe-associated molecular pattern, MAMP) реакциях вместе с OsCIPK14 (Kurusu et al., 2010).

Повышение $[Ca^{2+}]_{цит}$ и синтез реактивных форм кислорода (РФК) являются фундаментальными компонентами быстрых иммунных реакций на патогенные воздействия у растений и животных и эти исследования были опубликованы многими учеными (Schwessinger and Zipfel, 2008; Boller and Felix, 2009; Dubiella et al., 2013). Также они важны и для передачи сигнала от АБК в клетках устьиц, при прорастании семян, росте пыльцевой трубки и удлинении корня, как регулятор Na^+/K^+ -гомеостаза растений при солевом стрессе (Potocký et al., 2012). Несколько исследований показали, что поддерживается взаимосвязь между Ca^{2+} и повышением реактивных форм кислорода (РФК), поэтому была описана активация кальциевых каналов клеток устьиц и корней РФК (Pei et al., 2000; Demidchik et al., 2003; Hua et al., 2012) и наоборот, кальций усиливает накопление реактивных форм кислорода (Takeda et al., 2008).

Сигнальные пути кальция способны затрагивать и *NO*-сигнализацию, *NO*-реактивный свободный газообразный радикал. На сегодняшний момент доказано его участие в разных физиологических процессах, таких как рост корней, закрытие устьиц, гомеостаз железа и гормонов, адаптивные реакции к биотическим и абиотическим стрессам (Simontacchi et al., 2013). Наибольший прогресс в изучении функций оксида азота приходится на последние 10 лет после открытия его энзиматического происхождения в растении. Определено несколько вторичных посредников, через которые осуществляется влияние на клетку: цГМФ, протеинкиназы, белки, зависимые от посттрансляционных модификаций посредством *NO* и ряд генов (Yu et al., 2012).

Более десяти лет назад Грант с соавторами (Grant et al., 2000) продемонстрировали, что поврежденные болезнями листья растений имеют повышенный уровень цитозольного кальция, что является одним из этапов иммунного ответа растения. Ферменты активации кальцийпроницаемых каналов также могут контролировать *NO* (Garcia-Mata et al., 2003).

После открытия ряда генов кальцийзависимых белков стали изучать пути регуляции их экспрессии. Одним из таких компонентов является оксид азота. Определение проводили путем введения в растение самого газа или молекул предшественников для копирования эффекта эндогенного *NO*. Среди генов присутствуют представители ряда кальцийзависимых сигнальных каскадов, в том числе кальциевые сенсоры, Ca^{2+} -проницаемые каналы, помпы и другие Ca^{2+} -зависимые протеины (Jeandroz et al., 2013).

Кроме известных кальциевых депо, предложено участие аппарата Гольджи в генерации кальциевого сигнала. Оказалось, что эта структура не участвует в каких либо ответах и изменяет активность своих транспортеров кальция в ответ на гормональные стимулы, поддерживая при этом стабильную концентрацию кальция (Ordenesa et al., 2012).

Участие в фототропизме и фотореакциях

Свет – один из самых важных факторов окружающей среды, который служит для растений источником энергии и управляет всеми стадиями их развития (от прорастания семян до финальных стадий цикла развития). Прорастание семян, рост и ингибирование гипокотилей, рост семядолей, развитие хлоропластов, архитектуры растения, расположение клеток в листе, ионный обмен в клетках – все эти процессы регулируются светом. Рецепция осуществляется, по крайней мере, тремя семействами фоторецепторов: фитохромы, рецепторы синего света и УФ-В фоторецепторы.

Элементы цитоскелета, такие как микротрубочки и микрофиламенты, могут играть важную роль в механизме передачи, так как они формируют много связей в цепи трансдукции светового сигнала, особенно в деятельности ионных каналов. Функционирование Ca^{2+} -активируемых хлорных каналов плазмалеммы клеток харовых водорослей зависит от микротрубочек. В результате разрушения микротрубочек наблюдаются изменения в активации потенциалзависимых Ca^{2+} -управляемых каналов плазматической мембраны клеток моркови. Очевидно, это связано с двумя факторами: вязкие эластические свойства цитоскелета, который обеспечивает механическую связь между элементами клетки и его большая отрицательно заряженная поверхность. В ответ на формирование активной формы фоторецептора меняется положение и активность различных протеинов, таких как липидкиназы, фосфолипазы, G-белки на поверхности цитоскелета. *Mougeotia* – нитчатая зеленая морская водоросль, которая содержит единственный ленточный хлоропласт, способный вращаться вокруг продольной оси в ответ на изменение освещения. Последовательность передачи светового сигнала с некоторыми модификациями можно изобразить следующим образом: $P + h\nu \rightarrow P^* \rightarrow Ca^{2+} \rightarrow CaM \rightarrow$ модификация микротрубочек (микрофиламентов) \rightarrow вращение хлоропласта. Предполагается, что связывающие актин белки, киназы, так же как и различные вторичные посредники (Ca^{2+} , IP_3), включаются в передачу сигнала с участием актина цитоскелета. По аналогии с животными клетками последовательность передачи светового сигнала в раститель-

ных клетках могла быть следующей: $P + h\nu \rightarrow P^* \rightarrow$ G-белок \rightarrow аденилатциклаза \rightarrow цАМФ \rightarrow протеинкиназы \rightarrow элементы цитоскелета $\rightarrow Ca^{2+}$ -каналы \rightarrow увеличение количества цитозольного кальция \rightarrow метаболический ответ.

Синий свет – ключевой фактор, контролирующий рост растений и их морфогенез. Генетические исследования *Arabidopsis thaliana* показали, что этот диапазон спектра поглощают два рецептора: фототропин 1 (phototropin 1, phot1) и фототропин 2 (phototropin 2, phot2). Посредством их регулируются движения растений: фототропизмы, миграция хлоропластов, открытие устьиц, опускание листьев и их ориентация по свету (Inoue et al., 2010). Эти эффекты могут осуществляться путем сложного взаимодействия между сенсорами, путем обратной связи, через ряд фосфатаз, киназ, а также путем изменения ионного гомеостаза. Кальций также в этом участвует. Недавние исследования продемонстрировали, что фототропины способствуют мобилизации Ca^{2+} в ответ на синий свет и что phot1 и phot2 с разными механизмами вызывают увеличение Ca^{2+} в клетках листа соответственно изменениям интенсивности рассеянного света (Harada et al., 2007, 2013). При низких интенсивностях синего света phot1 способствует вхождению кальция исключительно через каналы плазматической мембраны. При большой интенсивности потока света увеличивается концентрация $[Ca^{2+}]_{цит}$ преимущественно за счет каналов внутриклеточных депо, так же как и каналами ПМ. Интересно, что угнетающее действие ингибиторов фосфолипазы С на ответы диких типов растений являются более заметными, нежели в единственном мутанте phot1. Это указывает на некоторое функциональное взаимодействие между phot1 и phot2, вызывающее изменения в Ca^{2+} цитозоля (Harada et al., 2003).

Из-за разной светочувствительности и избыточной функции между phot1 и phot2 ранние исследования сконцентрировались на phot1-зависимых физиологических ответах, у которых наблюдается зависимый от синего света поток кальция из апопласта в клетки мезофилла деэтиолированных и этиолированных проростков.

В последних исследованиях было доказано, что в этиолированных проростках phot2 способствует увеличению $[Ca^{2+}]_{цит}$ за счет внутриклеточных депо. Это доказывает отличие механизмов влияния фототропинов на клетки (Zhao et al., 2013).

Ca^{2+} и рост пыльцевых трубок

Рост пыльцевых трубок – быстрый и высокополяризованный процесс. Динамика неорганических ионов играет одну из важнейших ролей. Четыре иона – Ca^{2+} , H^+ , K^+ и Cl^- – самые важные из них, с приоритетом у кальция. Апикальный градиент Ca^{2+} важен для направленного роста и модуляции полярности клетки. Частота осцилляций $[Ca^{2+}]_{цит}$ пропорциональна темпам роста пыльцевой трубки. Некоторые Ca^{2+} -связывающие белки также принимают участие в обратной регуляции роста пыльцевой трубки. Среди них кальмодулин, кальцийзависимые протеинкиназы (CDPKs), белки цитоскелета. В частности, CDPKs являются важнейшими регуляторами роста путем влияния на актиновые филаменты цито-

скелета кукурузы, фосфорилируя актиндеполимеризующие факторы, что приводит к повторной пересборке актиновых филаментов. В *Arabidopsis* найдены генетические доказательства участия кальциевой протеинкиназы 17 и 34 в росте пыльцевых трубок.

Многие процессы с участием кальция, такие как динамика цитоскелета, эндо- и экзоцитоз, прямо или косвенно участвуют в росте пыльцы (Helling et al., 2006; Konrad et al., 2011). На основе наблюдений известно, что кальций регулирует активность ионных каналов во многих других физиологических процессах. Активность или локализация на мембране потенциалзависимых K^+ -каналов модулируется кальциейрин В-подобными белками и взаимодействующими с ними киназами, которые играют важную роль в поглощении и распределении калия в клетке (Xu, 2006; Held et al., 2011). Ранние исследования не показали зависимости между калиевыми токами и изменениями внутриклеточного кальция, но методом петч-клемп изолированных протопластов пыльцевых трубок *Arabidopsis* доказано, что внутриклеточные токи калия зависят от колебаний $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$. Эта регуляция осуществлялась посредством взаимодействий кальцийзависимых протеинкиназ 11 и 24, локализованных в плазматической мембране. CDPK11 может фосфорилировать CDPK24 и работают они, как один киназный каскад, наподобие митогенактивируемой протеинкиназы. Регуляция активности потенциалзависимых каналов K^+ обратно регулируется двумя этими протеинкиназами (Zhao et al., 2013).

Сегодня хорошо известно, что среди всех известных видов клеток, которые поддавались изучению свободно-го внутриклеточного цитоплазматического кальция, на кончиках пыльцевых трубок его концентрация является самой высокой – около 2–10 мкМ при 20–200 нМ в базальной ее части. В противоположность этому внеклеточные концентрации могут варьировать в очень широких пределах от 10 до 10 000 мкМ. Апикальный приток ионов Ca^{2+} является основным источником создания этого градиента, в сочетании с субапикальной секрецией этого иона через плазматическую мембрану или закачку в депо (Hepler, 2012).

Кальциевый градиент необходим не только для роста пыльцевой трубки. Он влияет на направление роста и изменение его фокуса, приводит к переориентации оси роста по отношению к месту с высшей концентрацией Ca^{2+} . Рост по кальциевому градиенту устанавливается уже при регидратации пыльцевых зерен, где они в конечном счете определяют место прорастания пыльцы. Добавление нифедипина предотвращает создание кальциевого градиента, а также прорастание. Эксперименты с латрукулином В, который предотвращает полимеризацию актина, кроме того показали связь между динамикой актина и градиентом Ca^{2+} в пыльце лилии (Iwano et al., 2004; Cardenas et al., 2008).

Вышеупомянутые темпы роста пыльцевых трубок изменяются по амплитуде. То же наблюдается в осцилляциях цитоплазматического кальция (Hepler et al., 2012). $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ и темпы роста колеблются синхронно, с периодом 15–60 с. Колебания $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ отстают на 10–40° от темпов роста, тогда как входной ток Ca^{2+} отстает на 11 с от пика роста в *Lilium longiflorum*. Это соответствует сдвигу фаз на ~140°, касающихся периода ~30 с

(Holdaway-Clarke et al., 1997). Также важную роль в модуляции $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ играют CNGCs (Cyclic nucleotide gated channels) и недавние исследования показали важную роль каналов, управляемых глутаматными рецепторами, для нормального роста пыльцевой трубки. Повышение концентрации цитозольного кальция вызывает деполимеризацию F-актина с помощью актинсвязывающих белков (гельзолина, профилина и др.), что замедляет темпы роста. Механоактивируемые каналы плазматической мембраны в это время закрыты или не достаточно активны, а значит цитозольные концентрации Ca^{2+} снижаются, что приводит к реорганизации актинового цитоскелета и увеличению темпов роста. Непосредственно $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ может вызвать освобождение Ca^{2+} из внутренних запасов путем активации фосфолипазы С и освобождением инозитол-1,4,5-трифосфата (IP₃), который, в свою очередь, высвобождает Ca^{2+} из депо (Franklin-Tong et al., 1996). Увеличение $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ также способствует слиянию везикул на плазматической мембране, но еще не ясно – это прямой эффект влияния Ca^{2+} или косвенно опосредованный аннексинами и синаптоагминами (Hepler and Winship, 2010).

Этот целенаправленный транспорт экзоцитозных пузырьков служит основой отложения клеточной стенки в одном направлении, что необходимо для полярного роста.

Осцилляции цитозольного кальция наблюдаются в условиях *in vitro*, но *in vivo* они наблюдаются очень слабо или почти отсутствуют (Iwano et al., 2009). На сегодняшний день используются новейшие двухфотонные микроскопы для этих исследований, что позволяет получать данные с большой разрешающей способностью. Все же колебания обнаруживаются и их интенсивность и амплитуда пропорциональны росту пыльцевой трубки, следовательно они реагируют гомеостатически на возмущения и обеспечивают определенную стабильность.

При росте клеточной стенки Ca^{2+} также играет важную роль. На апикальной части клетки, путем экзоцитоза, наслаиваются пектиновые вещества и вместе с тургором клетки обеспечивают ее рост. Среди них преобладают метил-пектины, которые легко связывают ионы кальция, формируя гель с низкой силой связывания. Метил-пектиназа, выделенная наружу, деметилирует предшественник пектина и свободные молекулы сшиваются ионами кальция. Этот процесс увеличивает жесткость клеточной стенки. Для нормального роста пыльцевой трубки необходима концентрация Ca^{2+} вне клеток в диапазоне от 10 мкМ до 10 мМ, чтобы сохранить клеточные стенки достаточно жесткими на разрыв и достаточно гибкими для обеспечения роста (Hepler and Winship, 2010).

Тем не менее, внешний Ca^{2+} необходим не только для сшивания компонентов клеточной стенки. Прорастающим пыльцевым зернам и удлиняющимся пыльцевым трубкам необходим постоянный внешний источник кальция, в целях установления и поддержания необходимого внутреннего Ca^{2+} градиента. Обилие внешнего кальция даже повышает реакцию растущей пыльцевой трубки на ростовые стимулы (Bou Daher and Geitmann, 2011). Следовательно, значительные количества внеклеточного Ca^{2+} должны присутствовать в пестике и его клее (Ge et al., 2009).

Участие кальция в симбиотических отношениях с микроорганизмами и грибами

Дефицит поступления питательных веществ из окружающей среды ограничивает рост и развитие растений и многие из них взаимодействуют с разнообразными организмами для предотвращения этого. Ассоциация с эндомикоризными грибами помогает в питании, особенно для обеспечения фосфатами, и этот симбиоз помог становлению высших растений на суше в процессе их эволюции. Хорошо известные взаимодействия между азотфиксирующими бактериями и растениями семейства Fabaceae. Их симбиоз сопровождается обменом сигнальных молекул, что помогает в идентификации растением полезных бактерий, это взаимодействие строго специфическое и определяется, так называемым, Nod-фактором (nodulation factor, Nod). Связывание Nod осуществляется лектиннуклеотидфосфогидролазой (lectin nucleotide phosphohydrolase, LNP). Его влияние на клетки корней лотоса (*Lotus japonicus*) вызывает изменение внутриклеточной концентрации кальция в диких типах, что было подтверждено на мутантных по рецепторам к Nod растениях и сопровождалось деформацией корневых волосков (Miwa et al., 2006; Roberts et al., 2013).

После получения диффундирующих сигналов от микросимбионтов корни растения инициируют программы, связанные с развитием, которые приводят к инфекции ризоидных или микоризных грибов. Обе программы используют один и тот же сигнальный путь с несколькими характерными компонентами. В частности, в обоих типах симбиоза установлены характерные особенности изменения перинуклеарного и нуклеарного кальция. Вероятно, источником Ca^{2+} является ядерный люмен и связанная с ним эндоплазматическая сеть с целенаправленным выпуском кальция в ядерной оболочке (Caroen, 2011).

Генетический анализ *Medicago truncatula* помог идентифицировать несколько генов, которые отвечают за осуществление обоих типов симбиоза. Два из них (DMI1 и DMI2) стимулируют Ca^{2+} осцилляции, но точные механизмы и функции этих компонентов остаются неизвестными. DMI2 кодирует плазмалеммную рецепторподобную киназу, что облегчает передачу сигнала в клетку. DMI1 – катионный канал, локализованный преимущественно на внутренней ядерной оболочке (Caroen, 2011; Venkateshwaran, 2012). DMI3 кодирует кальмодулинзависимую протеинкиназу, взаимодействующую с обратнорегулированными компонентами, выступающую в роли декодера кальциевых осцилляций (Hayashi et al., 2010). Дополнительные гены кодируют три нуклеопорина (NUP85, NUP133 и NENA), также участвующие в колебаниях кальция (Groth et al., 2010). К передаче сигналов могут подключаться ядерные поры и кальциевые каналы ядерной оболочки, которые формируют так называемый путь Sym.

DMI1 играет важную роль в продукции Ca^{2+} осцилляций, но конкретные механизмы этого процесса неизвестны. Ортологи DMI1 обнаружены в *Lotus japonicus* и называются CASTOR и POLLUX (Charpentier et al., 2008), гороха (*Pisum sativum*) SYM8 (Edwards, 2007). CASTOR и POLLUX, хорошо известные кальций-кальмодулинзависимые протеинкиназы, которые высоко-

коконсервативны у разных растений (Banba et al., 2008; Chen et al., 2009). Они играют важную роль в Ca^{2+} осцилляциях при микоризной сигнализации.

DMI1 не является каналом, ответственным за высвобождение кальция, но, вероятно, он модулирует их активность (Venkateshwaran, 2012). Это похоже на регуляцию некоторых K^+ -зависимых каналов, основываясь на том, что POLLUX комплементарны K^+ транспорту в дрожжах (Charpentier, 2008). При симбиозе способ действия DMI1 должен способствовать поступлению катионов к ядерной оболочке для уравнивания зарядов, которое произойдет после высвобождения кальция в нуклеоплазму и цитоплазму. Катионный канал, таким образом, может изменить трансмембранный потенциал через ядерную мембрану, воздействуя на открытие потенциалуправляемых Ca^{2+} -каналов (Edwards et al., 2007).

Особенности колебаний Ca^{2+} связаны с активностью Ca^{2+} -насосов и Ca^{2+} -каналов. Помпы необходимы для повторно закачивания Ca^{2+} в депо после каждой вспышки, активно транспортируя Ca^{2+} против градиента концентрации, используя АТФ. Недавно найден SERCA тип кальциевых АТФаз – MCA8, которые расположены на внутренней ядерной оболочке *M. truncatula* и необходимы для осцилляций Ca^{2+} (Caroen, 2011). Эти насосы широко распространены в плазматических мембранах растительных клеток, а вариации их структуры указывают на дифференциальную регуляцию.

Ca^{2+} -каналы, освобождающие кальций из депо, могут зависеть от потенциала. После высвобождения Ca^{2+} в цитозоль и нуклеоплазму буфера, они связывают свободные ионы из-за их токсичности для клетки. Буферные системы, способные связать Ca^{2+} , могут играть важную роль в определении нелинейного поведения колебательной системы при Ca^{2+} -сигнализации (Falcke, 2004). В клетке присутствуют многочисленные молекулы, связывающие кальций, включая экзогенные красители и хелаторы Ca^{2+} .

Капоен с сотрудниками (Caroen et al., 2011) исследовали создание и передачу пространственной волны по ядерной оболочке и показали, что ключевые компоненты для формирования Ca^{2+} всплесков находятся на внутренней и внешней поверхностях мембраны ядра. При вычислениях допускался ряд приближений (с целью обеспечения эффективности вычислений), необходимых для пространственно-временного моделирования. Главной задачей для этих исследований являлось понимание механизмов влияния Ca^{2+} -связывающих компонентов на осцилляции Ca^{2+} .

Процесс моделирования допускает присутствие трех основных белков: K^+ -каналов, потенциалзависимых Ca^{2+} каналов и Ca^{2+} -АТФаз. Все эти компоненты присутствуют на ядерной мембране. K^+ -канал представлен белком DMI1 (Venkateshwaran et al., 2012), основным белком, задающим изменения мембранного потенциала. Полагают, что Ca^{2+} -каналы являются потенциалзависимыми. Так как DMI1 не имеет доменов-сенсоров, чувствительных к изменениям мембранного потенциала, поэтому можно предположить, что любые его изменения не повлекут за собой модуляцию активности канала. Ca^{2+} -помпы представлены MCA8, SERCA типами АТФаз (Caroen et al., 2011). Они способствуют закачке кальция против градиента концентрации с использова-

нием энергии АТФ. При моделировании предполагается, что ДМП1 в состоянии изменять потенциал мембраны, чтобы обеспечить противоток ионов против движения Ca^{2+} .

Модель принимает внутреннюю локализацию ядерной оболочки в клетках корневых волосков *Medicago truncatula*, базирующейся на преимущественном местонахождении ДМП1. Люмен ядра сопряжен с ЭПР и как предполагается, существует градиент кальция через внутреннюю ядерную оболочку с высокой концентрацией Ca^{2+} в люмене и низкой – в нуклеоплазме. Для упрощения допускается существование одного кальциевого депо ЭПР с сопряженным люменом ядра, который освобождает свое содержимое в нуклеоплазму. На основе этих допущений была создана математическая модель, подтвержденная экспериментально и описывающая осцилляции ядерного кальция в корневых волосках *Medicago truncatula* при симбиотических отношениях растения с грибом (Granqvist et al., 2012).

Другие исследования, описывающие симбиотические отношения корового слоя клеток корней растений, показали присутствие кальциевых осцилляций. Перед проникновением бактерий в клетки наблюдаются медленные колебания Ca^{2+} . По мере проникновения их в клетки частота колебаний возрастает. Одним из объяснений может быть изменение буферных характеристик цитоплазмы, что вызвано сигналом от микробов, таких как Nod-фактор, который станет доступным после проникновения бактерий через оболочку клетки (Sieberer et al., 2011).

Кальций и накопление жасмоновой кислоты

Жасмоновая кислота (ЖК) играет важную роль во взаимодействиях «растение – насекомое». При повреждении тканей растительными животными обычно очень сильно повышается концентрация ЖК, что, в свою очередь, активирует накопление метаболитов, которые функционируют в качестве защиты против травоядных животных.

Было продемонстрировано, что присутствие метилжасмоната способствует закрытию клеток устьиц с изменениями свободного цитоплазматического кальция. К этим изменениям причастна кальцийзависимая протеинкиназа 6 (calcium dependent protein kinase 6, CDPK6), способная изменять активность медленных кальциевых каналов плазматической мембраны (Munemasa et al., 2011). Другие протеинкиназы также участвуют в ранних этапах синтеза жасмоновой кислоты. Растения *Nicotiana tabacum* с сильно экспрессированными генами CDPK4 и CDPK5 накапливали большие количества ЖК. Анализ ферментов цепочки её синтеза не показал влияния киназ на их активность, как и генетических различий между мутантными формами по CDPK4 и CDPK5. Динамика ЖК у этих растений была подобной, исключая возможность уменьшения количества за счет разложения в диком типе. Для получения дополнительной информации изучили влияние протеинкиназ на количество предшественников синтеза ЖК – свободных жирных кислот $C_{18:3}$ и (9S,13S)-12-оксо-фитодиеновой кислоты (ОФДК). В диком типе наблюдалось уменьшения

уровня $C_{18:3}$, но количество ОФДК и ЖК увеличивалось, что указывает на регуляцию CDPK4 и CDPK5 ранних этапов синтеза ЖК. Возможно, этот эффект заключается в контроле активности оксидсинтазы и оксидциклазы, которые превращают 13(S)-гидропероксиоктадекатриеновую кислоту в ОФДК (Hettenhausen et al., 2012; Hettenhausen et al., 2013).

CML (calmodulin-like protein, CML) – семейство протеинов, имеющих три EF-домена и работающих как переключатели. Семейство генов CML включает около 50 белков, но специфически реагирует на элиситоры и повреждения насекомых только CML42. Также было описано влияние на экспрессию этого гена пептида грибов Avr9. Предположена также регуляция транскрипционным фактором WRKY (Segonzac et al., 2011). Обнаруживаются транскрипты CML42 при влиянии на клетку элиситоров, присутствующих в экстракте клеточной стенки мутантного гриба *Piriformospora indica*, который поддерживает рост проростков *Arabidopsis* (Vadassery et al., 2009). Эти исследования показывают, что экспрессия CML42 высока при влиянии многих биотических стимулов, включающих активацию PAMP, HAMP, и специфическую активацию элиситорами, что указывает на консервативность ранних сигнальных путей. Кроме того, эти вмешательства способствуют повышению цитозольного кальция и выбросу фитогормонов.

При сравнении растений с суперэкспрессированным CML42 и диким типом не наблюдается заметной разницы в концентрации ЖК и её производных. Однако в CML42 показана более сильная регуляция чувствительных к ЖК генов VSP2 и Thi2.1, в ответ на инвазию *S. littoralis*, что указывает на более высокую устойчивость к повреждениям. При этом ЖК действует на два пути, ERF и MYC2, которые функционируют антагонистически. При активации MYC2 растением запускается защитная реакция на борьбу с насекомым, ERF – активируются насекомым (Verhage et al., 2011). Потеря функции CML42 могла бы воздействовать на ответвление CML42 непосредственно. Интересно, что регуляция осуществляется не на уровне синтеза ЖК, а на уже задействованных сигнальных путях от ЖК.

Доказательства роли Ca^{2+} в регуляции биосинтеза ЖК исходят из того, что жасмонаты вызывают повышение Ca^{2+} путем активирования известных генов двупорового канала 1 (Two pore channel 1, TPC1) (Bonaventure et al., 2007). Обратная регуляция TPC1, мембранных катионных каналов тонопласта амплифицирует накопление ЖК после заражения. Неизвестно, каким образом кальций опосредствует сигналы от ЖК и способствует её восприятию клеткой. В *cml42* линиях концентрация кальция в ответ на действие ЖК выше, нежели в диком типе. С другой стороны, влияние *S. littoralis* на растения повышает в одинаковом количестве концентрацию кальция и не зависит от типа растения. Это значит, что CML42 повышает ЖК-индуцированное освобождение кальция и обратно регулирует это, и CML42 уменьшает Ca^{2+} -выброс в ответ на инвазию насекомых, поскольку потеря функции не имеет никакого эффекта.

Потеря функции экспрессии CML42 приводит к восстановлению у *S. littoralis* защиты от вредителей: личинки набирают меньше веса на мутантных растениях по сравнению с растениями дикого типа. Следовательно,

можно предположить, что CML42 отрицательно влияет на защиту растения, поскольку потеря функции этого гена способствует большему сопротивлению против травоядных животных. Роль CML42 в развитии растения была идентифицирована на опытах по связи с K1C (кальцийсвязывающий белок), который отрицательно регулирует рост ответвлений трихом (Dobney et al., 2009).

Ранние исследования многих систем показали, что Ca^{2+} -сигнализация отрицательно воздействует на защиту растения. В растениях ячменя потеря кальмодулинсвязывающих частей белков MLO для обратной регуляции защиты против ложной мучнистой росы, и Ca^{2+} -активируемый транскрипционный фактор SAMT3 отрицательно регулируют уровни салициловой кислоты, присоединяясь к белку-регулятору салициловой кислоты EDS1. WRKY11 и -17, также известны как обратные регуляторы основной защиты от бактериальной инфекции. Роль CML42 заключается в регуляции активации – деактивации упомянутых путей защиты. Также он способствует контролю экспрессии ферментов синтеза ряда фитогормонов (этилена, АБК).

Участие в абиотических стрессах

Кэмпфероловые гликозиды – высокомолекулярные флавоноиды листьев, стеблей и цветов арабидопсиса, которые защищают от ультрафиолетовой радиации (УФ). Известно, что CML42 способствует их продукции и накоплению. Растения *cml42* также были менее резистентны к УФ, подтверждая данное действие флавоновых гликозидов и различные роли кальциевых датчиков, таких как CML42, которые воспринимают действие Ca^{2+} . Среди других абиотических воздействий важна засуха, которая стимулирует продукцию АБК, что способствует закрытию устьиц и индукции экспрессии стрессактивируемых генов. *Cml42* вызывает накопление АБК в ответ на многократные циклы засухи, но при этом не формируется засухостойкий фенотип. Это указывает на CML42 отрицательную регуляцию уровней АБК во время стресса. CML9 – другой член семейства CML, известный как отрицательный регулятор в сигнальном пути АБК (Magnan et al., 2008). Кальциевый сенсор, который принадлежит к семейству кальцинеурин В-подобных белков (calcineurin B-like, CBL), также известный отрицательный регулятор в АБК-пути с контролем её синтеза (Vadassery et al., 2012).

При изучении холодостойкости *Populus euphratica* было продемонстрировано участие СРК10 в формировании устойчивости растения. Трансгенные растения, с гиперэкспрессией этого белка, содержали больше АБК, закрытие устьиц и повышенную толерантность к заморзанию. При этом усиливалась экспрессия генов, отвечающих за абиотический стресс, таких как RD29B и COR15A. Похожая ситуация наблюдалась и при засухе. Можно предположить, что СРК10 действует как положительный регулятор, реагирующий на холодовой и тепловой стресс (Chen et al., 2013).

Помимо сенсоров кальция, определенное место занимают и кальциевые транспортёры, особенно Р-АТФазы, которые в своей молекуле имеют CaM-свя-

зывающую последовательность и способны участвовать в ответах на биотический и абиотический стресс (Huda et al., 2013).

Таким образом, рассмотрены основные известные молекулярные механизмы регуляции гомеостаза кальция в клетках растений. Представленные данные имеют значение для понимания роли кальция в гомеостазе ионов и могут быть использованы для разработки высокоэффективных технологий питания культурных растений.

Библиографические ссылки

- Banba, M., Gutjahr, C., Miyao, A., Hirochika, H., Paszkowski, U., Kouchi, H., Imaizumi-Anraku, H., 2008. Divergence of evolutionary ways among common sym genes: CASTOR and CCaMK show functional conservation between two symbiosis systems and constitute the root of a common signaling pathway. *Plant Cell Physiol.* 49(11), 1659–1671.
- Baticic, O., Waadt, R., Steinhorst, L., Held, K., Kudla, J., 2010. CBL-mediated targeting of CIPKs facilitates the decoding of calcium signals emanating from distinct cellular stores. *Plant J.* 61(2), 211–222.
- Boller, T., Felix, G., 2009. A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 379–406.
- Bonaventure, G., Gfeller, A., Rodrigues, V., Armand, F., Farmer, E., 2007. The *fou2* gain-of-function allele and the wild-type allele of Two Pore Channel 1 contribute to different extents or by different mechanisms to defense gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 48(12), 1775–1789.
- Bou Daher, F., Geitmann, A., 2011. Actin is involved in pollen tube tropism through redefining the spatial targeting of secretory vesicles. *Traffic* 12, 1537–1551.
- Bradley, J., Reiser, J., Frings, S., 2005. Regulation of cyclic nucleotide-gated channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 343–349.
- Brini, M., Crafoli, E., 2009. Calcium pumps in heart and disease. *Physiol. Rev.* 89(4), 1341–1378.
- Capoen W., Sun, J., Wysham, D., Otegui, M.S., Venkateshwaran, M., Hirsch, S., Miwa, H., Downie, J.A., Morris, R.J., Ané, J.M., Oldroyd, G.E., 2011. Nuclear membranes control symbiotic calcium signaling of legumes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108(34), 14348–14353.
- Cardenas, L., Lovy-Wheeler, A., Kunkel, J., Hepler, P., 2008. Pollen tube growth oscillations and intracellular calcium levels are reversibly modulated by actin polymerization. *Plant Physiol.* 146, 1611–1621.
- Charpentier, M., Bredemeier, R., Wanner, G., Takeda, N., Schleiff, E., Parniske, M., 2008. *Lotus japonicus* CASTOR and POLLUX are ion channels essential for perinuclear calcium spiking in legume root endosymbiosis. *Plant Cell* 20(12), 3467–3479.
- Chen, C., Fan, C., Gao, M., Zhu, H., 2009. Antiquity and function of CASTOR and POLLUX, the twin ion channel-encoding genes key to the evolution of root symbioses in plants. *Plant Physiol.* 149, 306–317.
- Chen, J., Xue, B., Xia, X., & Yin, W., 2013. A novel calcium-dependent protein kinase gene from *Populus euphratica*, confers both drought and cold stress tolerance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441(3), 630–636.
- Chen, L., Ren, F., Zhou, L., 2012. The *Brassica napus* calcineurin B-like 1-CBL-interacting protein kinase 6 component is involved in the plant response to abiotic stress and ABA signalling. *J. Exp. Bot.* 63(17), 6211–6222.

- Cheng, N.-H., Pittman, J.K., Shigaki, T., Lachmansingh, J., LeClere, S., Lahner, B., Salt, D.E., Hirschi, K.D., 2005. Functional association of *Arabidopsis* CAX1 and CAX3 is required for normal growth and ion homeostasis. *Plant Physiol.* 138, 2048–2060.
- Dadacz-Narloch, B., Beyhl, D., Larisch, C., Lopez-Sanjurjo, E.J., Reski, R., Kuchitsu, K., Mueller, T.D., Becker, D., Schönknecht, G., Hedrich, R., 2011. A novel calcium binding site in the slow vacuolar cation channel TPC1 senses luminal calcium levels. *Plant Cell.* 23, 2696–2707.
- Day, S., Reddy, S., Ali, S., Reddy, A., 2002. Analysis of EF-hand-containing proteins in *Arabidopsis*. *Genome Biol.* 10(3), 1–24.
- Demidchik, V., Shabala, S., Coutts, K., Tester, M., Davies, J., 2003. Free oxygen radicals regulate plasma membrane Ca^{2+} - and K^{+} -permeable channels in plant root cells. *J. Cell Sci.* 116, 81–88.
- Ding, J., Richard, B., 1993. Mechanosensory calcium-selective cation channels in epidermal calls. *Plant J.* 3, 83–110.
- Dobney, S., Chiasson, D., Lam, P., Smith, S., Snedden, W., 2009. The calmodulin-related calcium sensor CML42 plays a role in trichome branching. *J. Biol. Chem.* 46, 31647–31657.
- Dubiella, U., Seybold, H., Durian, G., Komander, E., Lassig, R., 2013. Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110(21), 8744–8449.
- Edmond, C., Shigaki, T., Ewert, S., 2009. Comparative analysis of CAX2-like cation transporters indicates functional and regulatory diversity. *Biochem. J.* 418, 145–154.
- Edwards, A., Heckmann, A.B., Yousafzai, F., Duc, G., Downie, J.A., 2007. Structural implications of mutations in the pea SYM8 symbiosis gene, the DMII ortholog, encoding a predicted ion channel. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20, 1183–1191.
- Falcke, M., 2004. Reading the patterns in living cells: The physics of Ca^{2+} signaling. *Adv. Phys.* 53, 255–440.
- Franklin-Tong, V., Drobak, B., Allan, A., Watkins, P., Trewas, A., 1996. Growth of pollen tubes of *Papaver rhoeas* is regulated by a slow-moving calcium wave propagated by inositol 1,4,5-trisphosphate. *Plant Cell* 8, 1305–1321.
- Galva, C., Virgin, G., Helms, J., Gatto, C., 2013. ATP protects against FITC labeling of *Solanum lycopersicon* and *Arabidopsis thaliana* Ca^{2+} -ATPase ATP binding domains. *Plant Physiol. Biochem.* 71, 261–267.
- Garcia-Mata, C., Gay, R., Sokolowski, S., Hills, A., Lamattina, L., Blatt, M., 2003. Nitric oxide regulates K^{+} and Cl^{-} channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 11116–11121.
- Ge, L., Xie, C., Tian, H., Russell, S., 2009. Distribution of calcium in the stigma and style of tobacco during pollen germination and tube elongation. *Sex. Plant Reprod.* 22, 87–96.
- Gobert, A., Isayenkov, S., Voelker, C., Czempinski, K., Maathuis, F., 2007. The two-pore channel TPK1 gene encodes the vacuolar K^{+} conductance and plays a role in K^{+} homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 10726–10731.
- Granqvist, E., Wysham, D., Hazledine, S., Kozłowski, W., Sun, J., Charpentier, M., Martins, T.V., Haleux, P., Tsaneva-Atanasova, K., Downie, J.A., Oldroyd, G.E.D., Morris, R.J., 2012. Buffering capacity explains signal variation in symbiotic calcium oscillations. *Plant Physiol.* 160, 2300–2310.
- Grant, M., Brown, I., Adams, S., Knight, M., Ainslie, A., Mansfield, J., 2000. The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *Plant J.* 23, 441–450.
- Groth, M., Takeda, N., Perry, J., Uchida, H., Drlxl, S., Brachmann, A., Sato, S., Tabata, S., Kawaguchi, M., Wang, T.L., Parniske, M., 2010. NENA, a *Lotus japonicus* homolog of Sec13, is required for rhizodermal infection by arbuscular mycorrhiza fungi and rhizobia but dispensable for cortical endosymbiotic development. *Plant Cell* 22, 2509–2526.
- Hamamoto, S., Marui, J., Matsuoka, K., 2008. Characterization of a tobacco TPK-type K^{+} channel as a novel tonoplast K^{+} channel using yeast tonoplasts. *J. Biol. Chem.* 283, 1911–1920.
- Harada, A., Shimazaki, K., 2007. Phototropins and blue light-dependent calcium signaling in higher plants. *Photochem. Photobiol.* 83, 102–111.
- Harada, A., Sakai, T., Okada, K., 2003. phot1 and phot2 mediate blue light-induced transient increases in cytosolic Ca^{2+} differently in *Arabidopsis* leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 8583–8588.
- Harada, A., Takemiya, A., Inoue, S., Sakai, T., Shimazaki, K., 2013. Role of RPT2 in leaf positioning and flattening and a possible inhibition of phot2 signaling by phot1. *Plant Cell Physiol.* 54, 36–47.
- Hayashi, T., Banba, M., Shimoda, Y., Kouchi, H., Hayashi, M., Imaizumi-Anraku, H., 2010. A dominant function of CcAMK in intracellular accommodation of bacterial and fungal endosymbionts. *Plant J.* 63, 141–154.
- He, L., Yang, X., Wang, L., 2013. Molecular cloning and functional characterization of a novel cotton CBL-interacting protein kinase gene (GhCIPK6) reveals its involvement in multiple abiotic stress tolerance in transgenic plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 435(2), 209–215.
- Held, K., Pascaud, F., Eckert, C., Gajdanowicz, P., Hashimoto, K., Corratq-Faillie, C., Offenborn, J.N., Lacombe, B., Dreyer, I., Thibaud, J.B., Kudla, J., 2011. Calcium-dependent modulation and plasma membrane targeting of the AKT2 potassium channel by the CBL4/CIPK6 calcium sensor/protein kinase complex. *Cell Res.* 21, 1116–1130.
- Helling, D., Possart, A., Cottier, S., Klahre, U., Kost, B., 2006. Pollen tube tip growth depends on plasma membrane polarization mediated by tobacco PLC3 activity and endocytic membrane recycling. *Plant Cell* 18, 3519–3534.
- Hen, X., Gu, Z., Xin, D., Hao, L., Liu, C., Huang, J., Ma, B., Zhang, H., 2011. Identification and characterization of putative CIPK genes in maize. *J. Genet. Genomics.* 38(2), 77–87.
- Hepler, P., Winship, L., 2010. Calcium at the cell wall-cytoplasm interface. *J. Integr. Plant Biol.* 52, 147–160.
- Hepler, P., Kunkel, J., Rounds, C., Winship, L., 2012. Calcium entry into pollen tubes. *Trends Plant Sci.* 17, 32–38.
- Hettenhausen, C., Baldwin, I., Wu, J. (2013). *Nicotiana attenuata* MPK4 suppresses a novel jasmonic acid (JA) signaling-independent defense pathway against the specialist insect *Manduca sexta*, but is not required for the resistance to the generalist *Spodoptera littoralis*. *New Phytol.* 199(3), 787–799.
- Hettenhausen, C., Yang, D., Baldwin, I., Wu, J., 2012. Calcium-dependent protein kinases, CDPK4 and CDPK5, affect early steps of jasmonic acid biosynthesis in *Nicotiana attenuata*. *Plant Signal Behav.* 8(1), e22784.
- Hirschi, K., Korenkov, V., Wilganowski, N., Wagner, G., 2000. Expression of *Arabidopsis* CAX2 in tobacco. Altered metal accumulation and increased manganese tolerance. *Plant Physiol.* 124, 125–133.
- Holdaway-Clarke, T., Feijy, J., Hackett, G., Kunkel, J., Hepler, P., 1997. Pollen tube growth and the intracellular cytosolic calcium gradient oscillate in phase while extracellular calcium influx is delayed. *Plant Cell* 9, 1999–2010.
- Hua, D., Wang, C., He, J., Liao, H., Duan, Y., Zhu, Z., Guo, Y., Chen, Z., Gong, Z., 2012. A plasma membrane receptor kinase, GHR1, mediates abscisic acid- and hydrogen peroxide-regulated stomatal movement in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 2546–2561.

- Huda, K., Banu, M., Tuteja, R., Tuteja, N., 2013. Global calcium transducer P-type Ca^{2+} -ATPases open new avenues for agriculture by regulating stress signalling. *J. Exp. Bot.* 64(11), 3099–3109.
- Inoue, S., Takemiya, A., Shimazaki, K., 2010. Phototropin signaling and stomatal opening as a model case. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 587–593.
- Iwano, M., Entani, T., Shiba, H., Kakita, M., Nagai, T., Mizuno, H., Miyawaki, A., Shoji, T., Kubo, K., Isogai, A., Takayama, S., 2009. Fine-tuning of the cytoplasmic Ca^{2+} concentration is essential for pollen tube growth. *Plant Physiol.* 150, 1322–1334.
- Iwano, M., Shiba, H., Miwa, T., Che, F., Takayama, S., Nagai, T., Miyawaki, A., Isogai, A., 2004. Ca^{2+} dynamics in a pollen grain and papilla cell during pollination of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 136, 3562–3571.
- Jammes, F., Hu, H.-C., Villiers, F., Bouten, R., Kwak, M., 2011. Calcium-permeable channels in plant cell. *FEBS J.* 27, 4262–4276.
- Jeandroz, S., Lamotte, O., Astier, J., Rasul, S., Trapet, P., Beson-Bard, A., Bourque, S., Nicolas-Francès, V., Ma, W., Berkowitz, G.A., Wendehenne, D., 2013. There's more to the picture than meets the eye: Nitric oxide cross talk with Ca^{2+} signaling. *Plant Physiol.* 163, 459–470.
- Kang, J., Turano, F., 2003. The putative glutamate receptor 1.1 (AtGLR1.1) functions as a regulator of carbon and nitrogen metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 6872–6877.
- Kang, J., Mehta, S., Turano, F., 2004. The putative glutamate receptor 1.1 (AtGLR1.1) in *Arabidopsis thaliana* regulates abscisic acid biosynthesis and signaling to control development and water loss. *Plant Cell Physiol.* 45, 1380–1389.
- Knight, M., Campbell, A., Smith, S., Trewavas, A., 1991. Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* 352, 524–526.
- Konrad, K., Wudick, M., Feijy, J., 2011. Calcium regulation of tip growth: New genes for old mechanisms. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 721–730.
- Krebs, M., Beyhl, D., Gorlich, E., Al-Resheid, K., Marten, I., Stierhof, Y.-D., Hedrich, R., Schumacher, K., 2010. *Arabidopsis* V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation. *Plant Physiol.* 107(7), 3251–3256.
- Kurusu, T., Hamada, J., Hamada, H., Hanamata, S., Kuchitsu, K., 2010. Roles of calcineurin B-like protein-interacting protein kinases in innate immunity in rice. *Plant Signal Behav.* 8(5), 1045–1047.
- Li, J., Zhu, S., Song, X., Shen, Y., Chen, H., Yu, J., Yi, K., Liu, Y., Karplus, V.J., Wu, P., Deng, X.W., 2006. A rice glutamate receptor-like gene is critical for the division and survival of individual cells in the root apical meristem. *Plant Cell* 18, 340–349.
- Ma, W., Zhi, Q., Smigel, A., Walker, R., Verma, R., Berkowitz, G., 2009. Ca^{2+} , cAMP, and transduction of non-self-perception during plant immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 20995–21000.
- Magnan, F., Ranty, B., Charpentreau, M., Sotta, B., Galaud, J., Aldon, D., 2008. Mutations in AtCML9, a calmodulin-like protein from *Arabidopsis thaliana*, alter plant responses to abiotic stress and abscisic acid. *Plant J.* 56(4), 575–589.
- Manzoor, H., Chiltz, A., Madani, S., Vatsa, P., Schoefs, B., Pugin, A., Garcia-Brugger, A., 2012. Calcium signatures and signaling in cytosol and organelles of tobacco cells induced by plant defense elicitors. *Cell Calcium* 51(6), 434–444.
- Medvedev, C.C., 2005. Calcium signal system [Kalcievaya signalnaya sistema]. *Fiziologia Rasteniy* 52(2), 282–305 (in Russian).
- Miwa, H., Sun, J., Oldroyd, G.E., Downie, J.A., 2006. Analysis of calcium spiking using aameleon calcium sensor reveals that nodulation gene expression is regulated by calcium spike number and the developmental status of the cell. *Plant J.* 48, 883–894.
- Miwa, H., Sun, J., Oldroyd, G., Downie, J., 2006. Analysis of Nod-factor-induced calcium signaling in root hairs of symbiotically defective mutants of *Lotus japonicus*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19, 914–923.
- Munemasa, S., Hossain, M., Nakamura, Y., Mori, I., Murata, Y., 2011. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase, CPK6, functions as a positive regulator of methyl jasmonate signaling in guard cells. *Plant Physiol.* 155, 553–561.
- Nakagawa, Y., Katagiri, T., Shinozaki, K., Qi, Z., Tatsumi, H., Furuichi, T., Kishigami, A., Sokabe, M., Kojima, I., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Iida, K., Terashima, A., Nakano, M., Ikeda, M., Yamanaka, T., Iida, H., 2007. *Arabidopsis* plasma membrane protein crucial for Ca^{2+} influx and touch sensing in roots. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 104, 3639–3644.
- Nalefski, A., Falke, J., 1996. The C2 domain calcium-binding motif: Structural and functional diversity. *Protein Sci.* 5, 2375–2390.
- Ordenesa, V., Morenoc, I., Maturanac, D., Norambuenad, L., Trewavas, A., Orellana, A., 2012. *In vivo* analysis of the calcium signature in the plant Golgi apparatus reveals unique dynamics. *Cell Calcium* 52, 397–404.
- Pei, Z., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G.J., Grill, E., Schroeder, J.I., 2000. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406, 731–734.
- Peiter, E., 2011. The plant vacuole: Emitter and receiver of calcium signals. *Cell Calcium* 50, 120–128.
- Peiter, E., Maathuis, F., Mills, L., Knight, H., Pelloux, J., Hetherington, A.M., Sanders, D., 2005. The vacuolar Ca^{2+} -activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature* 434, 404–408.
- Piao, H., Xuan, Y., Park, S.H., Je, B.I., Park, S.J., Park, S.H., Kim, C.M., Huang, J., Wang, G.K., Kim, M.J., Kang, S.M., Lee, I.J., Kwon, T.R., Kim, Y.H., Yeo, U.S., Yi, G., Son, D., Han, C.D., 2010. OsCIPK31, a CBL-interacting protein kinase is involved in germination and seedling growth under abiotic stress conditions in rice plants. *Mol. Cells* 30(1), 19–27.
- Pittman, J., 2011. Vacuolar Ca^{2+} uptake. *Cell Calcium* 50, 139–146.
- Pittman, J., Shigaki, T., Marshall, J., Morris, J., Cheng, N., Hirschi, K., 2004. Functional and regulatory analysis of the *Arabidopsis thaliana* CAX2 cation transporter. *Plant Mol. Biol.* 56, 959–971.
- Potocký, M., Pejchar, P., Gutkowska, M., Jiménez-Quesada, M., Potocká, A., Alché Jde, D., Kost, B., Žárský, V., 2012. NADPH oxidase activity in pollen tubes is affected by calcium ions, signaling phospholipids and Rac/Rop GTPases. *J. Plant Physiol.* 169(16), 1654–1663.
- Roberts, N., Morieri, G., Kalsi, G., Rose, A., Stiller, J., Edwards, A., Xie, F., Gresshoff, P.M., Oldroyd, G.E., Downie, J.A., Etzler, M.E., 2013. Rhizobial and mycorrhizal symbioses in *Lotus japonicus* require lectin nucleotide phosphohydrolase, which acts upstream of calcium signaling. *Plant Physiol.* 161, 556–567.
- Sanchez-Barena, M., Martinez-Ripoll, M., Albert, A., 2013. Structural biology of a major signaling network that regulates plant abiotic stress: The CBL-CIPK mediated pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 5734–5749.
- Schwessinger, B., Zipfel, C., 2008. News from the frontline: Recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11(4), 389–395.
- Segonzac, C., Feike, D., Gimenez-Ibanez, S., Hann, D., Zipfel, C., Rathjen, J., 2011. Hierarchy and roles of pathogen-

- associated molecular pattern-induced responses in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol.* 156(2), 687–699.
- Shigaki, T., Pittman, J., Hirschi, K., 2003. Manganese specificity determinants in the *Arabidopsis* metal/ H^+ antiporter CAX2. *J. Biol. Chem.* 278, 6610–6617.
- Sieberer, B., Chabaud, M., Fournier, J., Timmers, A., Barker, D., 2011. A switch in Ca^{2+} spiking signature is concomitant with endosymbiotic microbe entry into cortical root cells of *Medicago truncatula*. *Plant J.* 69, 822–830.
- Simontacchi, M., García-Mata, C., Bartoli, C., Santa-María, G., Lamattina, L., 2013. Nitric oxide as a key component in hormone-regulated processes. *Plant Cell Rep.* 32(6), 853–866.
- Takeda, S., Gapper, C., Kaya, H., Bell, E., Kuchitsu, K., Dolan, L., 2008. Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science* 319, 1241–1244.
- Tikhonova, L., Pottosin, I., Dietz, K., Schwknrecht, G., 1997. Fast-activating cation channel in barley mesophyll vacuoles. Inhibition by calcium. *Plant J.* 11, 1059–1070.
- Vadassery, J., Ranf, S., Drzewiecki, C., Mithöfer, A., Mazars, C., Scheel, D., Lee, J., Oelmüller, R., 2009. A cell wall extract from the endophytic fungus *Piriformospora indica* promotes growth of *Arabidopsis* seedlings and induces intracellular calcium elevation in roots. *Plant J.* 59(2), 193–206.
- Vadassery, J., Reichelt, M., Hause, B., Gershenzon, J., Boland, W., Mithöfer, A., 2012. CML42-mediated calcium signaling coordinates responses to *Spodoptera* herbivory and abiotic stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 159, 1159–1175.
- Venkateshwaran, M., Cosme, A., Han, L., Banba, M., Satyshur, K.A., Schleiff, E., Parniske, M., Imaizumi-Anraku, H., Ané, J.M., 2012. The recent evolution of a symbiotic ion channel in the legume family altered ion conductance and improved functionality in calcium signaling. *Plant Cell* 24, 2528–2545.
- Verhage, A., Vlaardingerbroek, I., Raaymakers, C., Van Dam, N., Dicke, M., Van Wees, S.C., Pieterse, C.M., 2011. Rewiring of the jasmonate signaling pathway in *Arabidopsis* during insect herbivory. *Front Plant Sci.* 26(2), 47.
- Waadt, R., Schmidt, L., Lohse, M., Hashimoto, K., Bock, R., Kudla, J., 2008. Multicolor bimolecular fluorescence complementation reveals simultaneous formation of alternative CBL/CIPK complexes in planta. *Plant J.* 56, 505–516.
- Wang, R., Li, L.L., Cao, Z.H., Zhao, Q., Li, M., Zhang, L.Y., Hao, Y.J., 2012. Molecular cloning and functional characterization of a novel apple MdCIPK6L gene reveals its involvement in multiple abiotic stress tolerance in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 79(1–2), 123–135.
- Ward, J., Schroeder, J., 1994. Calcium-activated K^+ channels and calcium-induced calcium release by slow vacuolar ion channels in guard cell vacuoles implicated in the control of stomatal closure. *Plant Cell* 6, 669–683.
- White, P., 2000. Calcium channels in higher plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1465, 171–189.
- White, P., Bowen, H., Demidchik, V., Nichols, C., Davies, J., 2002. Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1564, 299–309.
- Wu, J., Qu, H., Jin, C., Shang, Z., Wu, J., Xu, G., Gao, Y., Zhang, S., 2011. cAMP activates hyperpolarization-activated Ca^{2+} channels in the pollen of *Pyrus pyrifolia*. *Plant Cell Rep.* 30, 1193–1200.
- Xu, J., Li, H.D., Chen, L.Q., Wang, Y., Liu, L.L., He, L., Wu, W.H., 2006. A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K^+ transporter AKT1 in *Arabidopsis*. *Cell* 125(7), 1347–1360.
- Yang, W., Kong, Z., Omo-Ikerodah, E., Xu, W., Li, Q., Xue, Y., 2008. Calcineurin B-like interacting protein kinase OsCIPK23 functions in pollination and drought stress responses in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Genet. Genomics* 35(9), 531–543.
- Yu, M., Yun, B., Spoel, S., Loake, G., 2012. A sleigh ride through the SNO: Regulation of plant immune function by protein S-nitrosylation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 424–430.
- Zhang, H., Lv, F., Han, X., 2013. The calcium sensor PeCBL1, interacting with PeCIPK24/25 and PeCIPK26, regulates Na^+/K^+ homeostasis in *Populus euphratica*. *Plant Cell Rep.* 32(5), 611–621.
- Zhao, J., Connorton, J., Guo, Y., Li, X., Shigaki, T., Hirschi, K.D., Pittman, J.K., 2009a. Functional studies of split *Arabidopsis* Ca^{2+}/H^+ exchangers. *J. Biol. Chem.* 284(49), 34075–34083.
- Zhao, J., Shigaki, T., Mei, H., Gu, Y., Cheng, N., Hirschi, K., 2009b. Interaction between *Arabidopsis* Ca^{2+}/H^+ exchangers CAX1 and CAX3. *J. Biol. Chem.* 284(7), 4605–4615.
- Zhao, L.-N., Shen, L.-K., Zhang, W.-Z., Zhang, W., Wang, Y., Wu, W.-H., 2013. Ca^{2+} -dependent protein kinase11 and 24 modulate the activity of the inward rectifying K^+ channels in *Arabidopsis* pollen tubes. *Plant Cell* 25(2), 649–661.
- Zhao, X., Wang, Y.-L., Qiao, X.-R., Wang, J., Wang, L.-D., Xu, C.-S., Zhang, X., 2013. Phototropins function in high-intensity blue light-induced hypocotyl phototropism in *Arabidopsis* by altering cytosolic calcium. *Plant Physiol.* 162(3), 1539–1551.

Надійшла до редколегії 05.04.2014