ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ, 2020, том 67, № 4, с. 378–388

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 581.1

ДЕЙСТВИЕ ЭФФЕКТОРОВ Ca^{2+}-СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ И ОЛИГОСАХАРИНА OSRG НА ИУК-ИНДУЦИРУЕМОЕ ФОРМИРОВАНИЕ АДВЕНТИВНЫХ КОРНЕЙ НА ЭКСПЛАНТАХ ГИПОКОТИЛЕЙ ГРЕЧИХИ

© 2020 г.
И. А. Ларская[a],*, О. В. Горшков[a], О. И. Трофимова[a], Т. А. Горшкова[a]

[a] *Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Федеральный исследовательский центр "Казанский научный центр Российской академии наук", Казань, Россия*

**e-mail: pzl@mail.ru*

Поступила в редакцию 20.11.2019 г.
После доработки 25.12.2019 г.
Принята к публикации 13.01.2020 г.

Взаимодействие различных сигнальных путей при развитии корневой системы исследовали на примере влияния эффекторов Ca^{2+}-сигналинга и стимулирующего ризогенез олигосахарина (OSRG) на ИУК-индуцируемое формирование адвентивных корней. Определение чувствительности стадий корнеобразования к ИУК, Ca^{2+} и олигосахарину на культивируемых эксплантах гипокотилей гречихи (*Fagopyrum esculentum* Moench) показало, что действие Ca^{2+}, как и OSRG относится к ранним стадиям процесса формирования корней и предшествует действию гормона. Ауксин может быть внесен в среду с задержкой, но не позднее, чем через час после начала культивирования эксплантов, а Ca^{2+} должен находиться в среде с самого начала культивирования. Количество ИУК-индуцированных адвентивных корней на сегментах гипокотилей гречихи уменьшалось при действии блокаторов Ca^{2+}-каналов (верапамил, дилтиазем), соединений, влияющих на высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ (рутениевый красный, неомицин), а также антагонистов кальмодулина (хлорпромазин, флуфеназин). С использованием блокатора кальциевых каналов (дилтиазем) показано, что эффект олигосахарина не зависел от функционирования потенциал-зависимых каналов плазмалеммы. Анализ данных профилирования транскриптома культивируемых эксплантов выявил в анализируемых образцах экспрессию 149 генов (TGR > 5), имеющих отношение к Ca^{2+}-сигналингу. Профиль экспрессии этих генов существенно менялся в ходе ИУК-индуцированного корнеобразования, при этом внесение OSRG оказывало эффект на экспрессию лишь некоторых из них.

Ключевые слова: *Fagopyrum esculentum*, адвентивное корнеобразование, Ca^{2+}-сигналинг, ИУК, олигосахарины

DOI: 10.31857/S0015330320040119

ВВЕДЕНИЕ

Адвентивные корни – это корни, имеющие постэмбриональное происхождение и формирующиеся на поверхности стеблей, листьев, гипокотилей [1]. Их образование регулируется большим количеством экзогенных и эндогенных факторов, среди которых главенствующее место отводится ауксину – основному индуктору и ключевому элементу, объединяющему различные сигнальные пути, вовлеченные в процесс формирования корней [1]. Показано его взаимодействие практически со всеми фитогормонами, которое может носить либо синергический, либо антагонистический характер в зависимости от стадии развития корня [2]. Известно, что ауксин способствует адвентивному корнеобразованию через NO-опосредуемый путь с МАРК-каскадами в качестве нисходящего сигнала [3]. В роли сигнальных молекул в ауксин-индуцированном адвентивном корнеобразовании также функционируют H_2O_2 и цГМФ [4].

Другим универсальным сигналом является Ca^{2+}, который служит в качестве основного вторичного мессенджера во многих клеточных процессах [5]. Повышение концентрации цитозольного Ca^{2+} наблюдается в течение нескольких минут после применения ауксина, показывая, что ауксин является мощным индуктором кальциевого сигнала [6]. В свою очередь, кратковременное изменение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме вовлечено как в процесс выхода ауксина из клеток через релокализацию PIN-белков [7], так и в

приток ауксина, опосредованный AUX-переносчиками [8]. Ингибиторы транспорта ауксина способны блокировать также и передвижение Ca^{2+} [9], а хелаторы кальция и блокаторы кальциевых каналов подавляют ауксин-зависимую элонгацию сегментов эпикотилей гороха [10]. Несмотря на то, что не показано прямого взаимодействия между двумя эффекторами, имеющиеся данные указывают на существование сложной системы прямых и обратных связей между Ca^{2+} и ауксиновой сигнализацией.

С применением ингибиторного анализа на побегах тополя, проростках огурца и маша, было показано, что вещества, влияющие на внутриклеточное содержание Ca^{2+} или передачу кальциевого сигнала, вызывают снижение ИУК-индуцируемого формирования адвентивных корней [4, 11, 12]. При осуществлении этого процесса Ca^{2+} находится во взаимосвязи с NO-, цГМФ- и MAP-киназной системами [3, 4]. Очевидно, что приведенный перечень регуляторов процесса корнеобразования далеко не полный, поскольку из-за вовлеченности как ИУК, так и Ca^{2+} в большое количество процессов необходимы дополнительные участники, обладающие более «точечным ударом» и позволяющие обеспечить точность передачи сигнала.

Начиная с 80-х годов, появились данные о новых регуляторных молекулах – олигосахаринах – фрагментах клеточной стенки, обладающих биологической активностью [13, 14]. Разрыхление клеточной стенки (в том числе, при действии ауксина), связанное с ростом, развитием и образованием новых органов, включает ряд гидролитических процессов, что способствует высвобождению из полимеров клеточной стенки растворимых фрагментов – олигосахаридов, которые могут обладать значительным морфогенным потенциалом [13, 14]. Различные олигосахарины в основном оказывают ингибирующий эффект на процессы, индуцируемые ауксином, такие как удлинение сегментов стеблей гороха [15] или формирование адвентивных корней [13]. Механизм регуляции олигосахаринами морфогенных реакций растительного организма все еще непонятен. Вместе с тем показано, что одной из первых реакций на некоторые олигосахариды (олигогалактурониды) служит повышение уровня цитозольного Ca^{2+} [16].

В нашей лаборатории получена фракция олигосахаридов, которая обладает способностью увеличивать количество ИУК-индуцируемых корней на различных модельных системах (OSRG – **o**ligo**s**accharin that stimulates **r**hizo**g**enesis) [17]. Учитывая тесную связь между передачей ауксинового сигнала и Ca^{2+}-сигнализацией, а также между эффектом ауксинов и олигосахаринами, и доказанную взаимосвязь этих соединений с процессами роста и развития [17, 18], целью настоящего исследования явилось изучение взаимодействия между этими эффекторами в процессе формирования адвентивных корней на эксплантах гипокотилей гречихи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований служили сегменты гипокотилей гречихи. Для их получения семена гречихи (*Fagopyrum esculentum* Moench) стерилизовали 10 мин в 2% растворе гипохлорита натрия, а затем проращивали в течение 4 суток на 1/2 нормы агаризованной среды Мурасиге-Скуга (MS/2) [19]. Из средней части гипокотиля вырезали сегменты длиной 1 см, которые разделяли вдоль на две части, помещали срезом вниз в чашки Петри с жидкой средой MS/2 и культивировали в течение 5 суток в темноте при 25°C. Среда MS/2 содержала 2% сахарозы, для агаризованной среды вносили 0.8% агара. Все работы по выращиванию гипокотилей, приготовлению и культивированию эксплантов выполняли стерильно.

Экстракцию олигосахарина OSRG из проростков гороха (*Pisum sativum* L.) и последующую очистку выполняли согласно разработанной ранее методике [14], в основе которой лежит поэтапная очистка экстрагированных буфером соединений с использованием последовательных стадий хроматографии, включающих катионную, анионообменную хроматографию и гель-фильтрацию. Условия подбирались с учетом высокой гидрофильности нейтральных олигосахаридов и отсутствия у них зарядов, а также с целью обеспечить удаление примесей, обладающих биологической активностью (белки, фенолы) и сохранить олигосахариды в процессе извлечения их из растительной ткани. Детальное описание методики приведено в недавней работе [20]. В процессе очистки тестировали активность различных фракций на разработанной ранее тест-системе – сегментах гипокотилей гречихи, на которых с помощью ИУК было индуцировано образование адвентивных корней [14]. Подсчет корней (длиной не менее 2 мм) проводили визуально на пятые сутки инкубации. Отобранная углеводная фракция, стимулирующая ризогенез, была обозначена как OSRG (**o**ligo**s**accharin that stimulates **r**hizo**g**enesis). Моносахаридный анализ OSRG выявил остатки галактозы, арабинозы, глюкозы и рамнозы (соответственно, 37, 29, 23 и 9 мол.%); судя по спектру поглощения, фракция не содержала неуглеводных примесей [20].

Используемые эффективные концентрации экзогенного Ca^{2+}, ИУК, а также других исследуемых ингибиторов и эффекторов были выбраны, основываясь на результатах предварительных экспериментов. Во всех экспериментах применяли 3 мМ Ca^{2+}, что соответствует его концентрации в среде Мурасиге-Скуга [19], 3 мкМ ИУК и

5 мкг/мл OSRG. Концентрации остальных эффекторов: дилтиазем – 12.5 мкМ, верапамил – 25 мкМ, неомицин – 12.5 мкМ, рутениевый красный – 2.5 мкМ, хлорпромазин – 25 мкМ, флуфеназин – 50 мкМ (“Sigma-Aldrich”, USA). При изучении действия эффекторов Ca^{2+}-сигнальной системы они вносились одновременно с ИУК в начале культивирования эксплантов на весь его период. При анализе эффектов различных комбинаций ИУК, олигосахарина (OSRG) и дилтиазема на формирование корней сопоставлялось действие: (а) каждого из этих эффекторов по отдельности в течение всего периода культивирования, (б) возможных комбинаций этих эффекторов (ИУК + OSRG или ИУК + дилтиазем, или OSRG + дилтиазем, или ИУК + OSRG + дилтиазем) в течение всего периода культивирования, (в) предобработки в течение одного часа одними эффекторами с последующим переносом в среду с другими (с OSRG на ИУК; с OSRG + дилтиазем на ИУК; с OSRG на ИУК + дилтиазем). Каждый эксперимент был выполнен в трех повторностях. Для каждого варианта использовали не менее 10 эксплантов. Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Microsoft Office Excel 2010. В табл. 1 и на рис. 2, 3 приведены средние значения и их стандартные ошибки.

Для анализа экспрессии генов, активных в ходе индукции корнеобразования под действием олигосахарина OSRG, были использованы транскриптомы сегментов гипокотилей гречихи, культивируемых на среде с добавлением ИУК (IAA) или ИУК+олигосахарин (IAA + OS) в течение 6 и 24 часов [20]. Соответствующие варианты были обозначены как: IAA (6 h), IAA + OS (6 h), IAA (24 h) и IAA + OS (24 h). Экстракцию тотальной РНК проводили из 10 эксплантов каждого образца путем комбинированного метода лизиса растительных тканей с использованием аналога реагента TRIzol (“Евроген”, Россия) и RNeasy Plant Mini Kit (“Qiagen”, Германия). Для максимального удаления ингибиторов (полифенолы, полисахариды) последующих ферментативных реакций, в ходе экстракции РНК был использован набор Plant RNA Isolation Aid (“Ambion”, США). Подготовку библиотек кДНК и последующее секвенирование проводили с использованием TruSeq Sample Prep Kit v3 (“Illumina”, США) и Illumina HiSeq2500. Оценку качества секвенирования и очистку прочтений от адаптеров и контаминаций рРНК в библиотеках ридов, полученных в виде файлов fastq, проводили с использованием программ FastQC (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) и bbtools (https://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/). Расчет дифференциально-экспрессируемых генов (ДЭГ) осуществляли с помощью пакета R “DEseq2” [21]. Значения экспрессии представлены в виде нормализованных TGR (total gene reads). В качестве порога для дифференциально-экспрессируемых генов считали значения FC (fold change) $\geq |2|$ при $P \leq 0.05$. Volcano plot, отображающий дифференциальную экспрессию между образцами, построен с использованием пакета R “Enhanced Volcano” [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Формирование адвентивных корней в зависимости от времени и порядка внесения ИУК и Ca^{2+} в среду культивирования

Одним из подходов для изучения характера взаимодействия разных физиологически активных соединений служит анализ изменений эффекта в зависимости от времени и порядка их добавления к растительным объектам. Такой подход, например, позволил выявить, что олигосахарин OSRG эффективен только на ранних стадиях индукции ауксином образования адвентивных корней [17]. Чтобы исследовать появление корней на эксплантах гречихи в зависимости от времени и порядка внесения в среду культивирования ИУК и Ca^{2+}, экспланты сначала помещали в среду с обоими эффекторами, а затем, по истечении указанного промежутка времени (диапазон от 30 минут до 48 часов), переносили на среду, содержащую либо ИУК, либо Ca^{2+}, где они оставались до конца культивирования (рис. 1, варианты I, II). Или, наоборот, экспланты сначала инкубировали в среде, содержащей один из эффекторов (ИУК или Ca^{2+}), используя те же временные интервалы, а затем переносили в среду, содержащую оба эффектора (рис. 1, варианты III, IV). Для сравнения в качестве контрольного варианта использовали экспланты, культивируемые во время всего эксперимента в присутствии ИУК и Ca^{2+}; количество корней, формируемое в таких условиях, составляло 12.0 ± 0.8 корней на эксплант.

При переносе из среды, содержащей и Ca^{2+}, и ИУК в среду, содержащую только Ca^{2+} или только ИУК, экспланты необходимо было выдержать на среде с обоими эффекторами не менее 24 часов, чтобы достичь такого же количества корней, которое наблюдалось в контрольном варианте (табл. 1, колонки I, II). По истечении этого периода времени удаление одного из эффекторов из среды культивирования уже не оказывало влияния на их количество.

При обратной постановке эксперимента, когда экспланты переносили из среды, содержащей либо только ИУК, либо только Ca^{2+}, в среду, содержащую оба эффектора, количество корней сильно зависело от того, какой эффектор присутствовал на первой стадии эксперимента (табл. 1, колонки III, IV). Так, инкубация в среде с кальцием, но без гормона в течение 1–2 часов не оказывала негативного воздействия на количество корней, и при последующем переносе на среду, содержа-

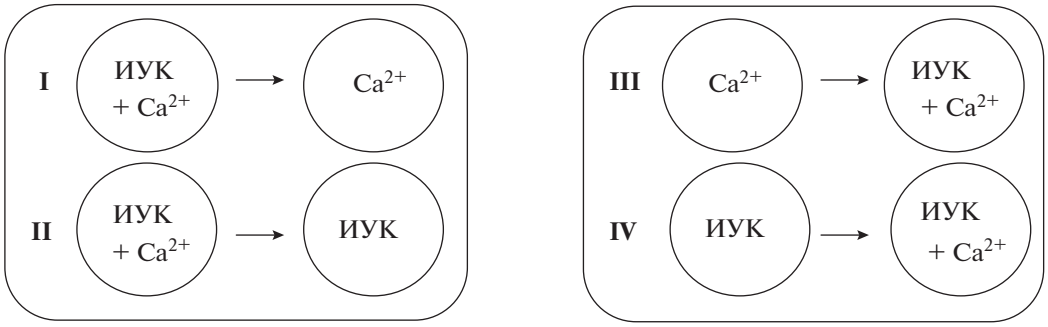

Рис. 1. Схема эксперимента по установлению периодов культивирования в средах с различными комбинациями ИУК и Ca^{2+}, требуемых для формирования корней на эксплантах гипокотилей гречихи.

щую и Ca^{2+}, и ИУК, экспланты формировали то же количество корней, как и в контрольном варианте (табл. 1, колонка III). Более длительное культивирование в среде с Ca^{2+}, но в отсутствии гормона имело негативный эффект, и чем позже осуществлялся перенос на среду с обоими эффекторами, тем меньше было количество корней. При добавлении гормона через 48 ч после начала культивирования его эффект отсутствовал полностью, и количество корней на эксплантах было таким же, как при их культивировании в среде без гормона в течение всего исследуемого периода, и составляло 3–4 корня на эксплант.

Если при инкубации в среде с Ca^{2+}, но без ИУК допускался, по крайней мере, 1–2 часовой лаг-период до внесения гормона, без негативного влияния на количество корней (табл. 1, колонка III), то инкубация в среде без Ca^{2+} даже в течение 30 минут отрицательно сказывалась на количестве корней, несмотря на присутствие гормона в среде культивирования (табл. 1, колонка IV).

Действие эффекторов Ca^{2+}-сигнальной системы на формирование адвентивных корней

Для дальнейшей характеристики роли Ca^{2+} в процессе формирования адвентивных корней было исследовано действие ингибиторов Ca^{2+} каналов и антагонистов кальмодулина – ключевого Ca^{2+}-сенсорного белка.

Обработка эксплантов блокаторами кальциевых каналов, подавляющих либо вход ионов кальция извне – верапамилом (25 мкМ) и дилтиаземом (12.5 мкМ), либо выход Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ – неомицином (12.5 мкМ) и рутениевым красным (2.5 мкМ), приводила к снижению количества корней на эксплантах (рис. 2). Антагонисты кальмодулина – хлорпро-

Таблица 1. Количество корней, образующихся на сегментах гипокотилей гречихи, в зависимости от различных комбинаций ИУК и Ca^{2+} в среде культивирования.

Время культивирования в первой среде, ч	Количество корней, формируемых на эксплантах, шт./эксплант			
	I	II	III	IV
	ИУК + Ca^{2+} → Ca^{2+}	ИУК + Ca^{2+} → ИУК	Ca^{2+} → ИУК + Ca^{2+}	ИУК → ИУК + Ca^{2+}
0.5	–	3.0 ± 0.4	11.4 ± 1.4	6.0 ± 0.3
1	4.3 ± 0.3	3.0 ± 0.3	11.9 ± 1.5	–
2	3.5 ± 0.8	–	11.0 ± 1.6	–
3	3.3 ± 0.3	2.0 ± 0.1	9.7 ± 0.7	4.0 ± 0.2
5	2.5 ± 0.5	4.5 ± 0.5	8.5 ± 1.6	2.0 ± 0.1
12	2.0 ± 0.4	8.0 ± 0.3	6.0 ± 0.9	2.5 ± 0.2
24	12.7 ± 1.1	12.0 ± 1.2	4.3 ± 0.5	2.0 ± 0.1
48	12.3 ± 1.3	–	3.7 ± 0.9	–

Примечание: подсчет корней осуществляли на пятые сутки культивирования, начиная от момента помещения эксплантов на первую среду. Используемые концентрации: ИУК – 3 мкМ; Ca^{2+} – 3 мМ.

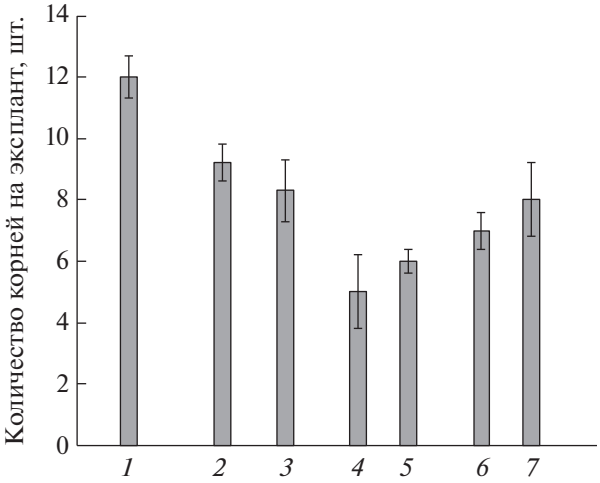

Рис. 2. Действие эффекторов Ca^{2+}-сигнальной системы на ИУК-индуцированное формирование адвентивных корней на сегментах гипокотилей гречихи. Ингибиторы вносились одновременно с ИУК в начале культивирования эксплантов на весь период инкубации.
1 – ИУК (3 мкМ); *2* – дилтиазем (12.5 мкМ); *3* – верапамил (25 мкМ); *4* – неомицин (12.5 мкМ); *5* – рутениевый красный (2.5 мкМ); *6* – хлорпромазин (25 мкМ); 7 – флуфеназин (50 мкМ).

мазин и флуфеназин – в концентрациях 25 мкМ и 50 мкМ, соответственно, также оказывали ингибирующий эффект на процесс формирования корней (рис. 2).

Действие дилтиазема и олигосахарина (OSRG) на формирование адвентивных корней

Для изучения сопряженности в эффектах олигосахарина и экзогенного кальция на ИУК-индуцируемое образование адвентивных корней сопоставлено действие на этот процесс различных комбинаций ИУК, олигосахарина и блокатора кальциевых каналов дилтиазема (рис. 3). Обнаружено, что если ИУК повышала количество корней (12.0 ± 0.8 корней на эксплант), по сравнению с безгормональным вариантом (3.4 ± 0.5 корней на эксплант), то культивирование эксплантов в среде без гормона только с OSRG или только с дилтиаземом, не оказывало эффекта, и количество корней в этих вариантах не превышало 3-4 корней на эксплант (рис. 3). При одновременном добавлении ИУК и OSRG в среду культивирования количество корней увеличивалось до 16.2 ± 0.8 корней на эксплант, что примерно на 30% выше количества корней, индуцируемых одним гормоном (рис. 3). Обработка эксплантов дилтиаземом вместе с ИУК приводила к снижению количества корней приблизительно на 25% (9.1 ± 0.4 корней на эксплант). Культивирование эксплантов в среде с добавлением одновременно и OSRG, и дилтиазема, но без гормона давало количество корней, сопоставимое с безгормональным вариантом. При одновременном внесении в среду культивирования всех трех эффекторов (ИУК, OSRG и дилтиазем) количество корней было сопоставимо с действием одной ИУК (рис. 3).

Предобработка эксплантов OSRG в течение часа с последующим переносом в среду, содержащую ИУК, вызывала дополнительное увеличение количества корней по сравнению с тем, что было получено при инкубации как с одним гормоном, так и при одновременном добавлении OSRG и ИУК в среду культивирования (рис. 3). Такой же эффект наблюдался и в том случае, если вместе с OSRG вносили дилтиазем. Однако предобработка эксплантов OSRG не имела эффекта, если экс-

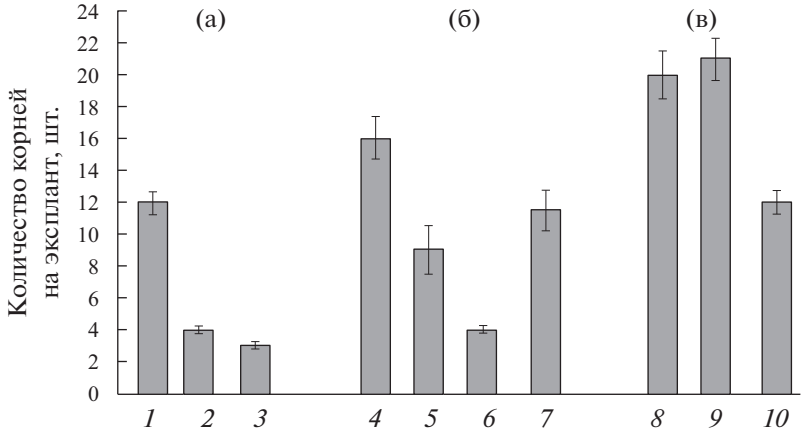

Рис. 3. Действие ИУК, олигосахарина и дилтиазема на формирование корней на эксплантах гипокотилей гречихи. Концентрации: ИУК – 3 мкМ, олигосахарин (OSRG) – 5 мкг/мл, дилтиазем – 12.5 мкМ. (а) – Действие одного эффектора: *1* – ИУК; *2* – OSRG; *3* – дилтиазем; (б) – действие различных комбинаций эффекторов: *4* – ИУК + OSRG; *5* – ИУК + дилтиазем; *6* – OSRG + дилтиазем; *7* – ИУК + OSRG + дилтиазем; (в) – предобработка одними эффекторами с последующим переносом в среду с другими. Время предобработки – 1 час: *8* – с OSRG на ИУК; *9* – с OSRG + + дилтиазем на ИУК; *10* – с OSRG на ИУК + дилтиазем.

планты потом переносили в среду, содержащую ИУК и дилтиазем.

Анализ экспрессии генов, имеющих отношение к Ca^{2+}-сигналингу

С целью выявления возможных механизмов участия Ca^{2+} в ИУК-индуцируемом процессе образования адвентивных корней при стимулирующем действии OSRG, мы охарактеризовали изменения в экспрессии генов, имеющих отношение к Ca^{2+}-сигналингу при добавлении OSRG. Для этого были проанализированы и сопоставлены опубликованные ранее полные транскриптомы сегментов гипокотилей гречихи, культивируемых на среде MS/2 с 3 мМ Ca^{2+} в присутствии только ИУК или ИУК + OSRG [20].

Учитывая, что и OSRG, и Ca^{2+} вовлечены в ранние этапы развития ризогенной программы, были выбраны две временные точки, отражающие начальные стадии процесса корнеобразования: первая (6 часов от начала культивирования), на которой не происходит значительных морфологических изменений, охватывает различные процессы, связанные с преодолением последствий нарезания эксплантатов, спецификацией клеток-основателей и антиклинальными/периклинальными делениями. Второй этап (24 ч от начала культивирования), который в основном включает деление клеток и рост зачатка корня внутри родительской ткани, заканчивается формированием куполообразного примордия.

Среди генов, имеющих достоверный уровень экспрессии (TGR > 5) хотя бы в одном из анализируемых образцов, было выявлено 149 генов, кодирующих белки, которые либо участвуют в транспортировке Ca^{2+} (Ca^{2+}-АТФазы, Na^+/Ca^{2+}-обменники, Ca^{2+}-каналы), либо относятся к белкам-сенсорам (Ca^{2+}/кальмодулин-протеинкиназы, Ca^{2+}-связывающие белки и пр.), либо являются другими Ca^{2+}-регулируемыми белками (факторы транскрипции, аннексины). Идентификационные номера этих генов обозначены прямоугольными рамками на рисунке 4, где представлено попарное сравнение экспрессии в исследуемых образцах всех 24929 генов, для которых выявлена соответствующая мРНК (normalized TGR > 5).

При добавлении OSRG в среду культивирования подавляющее большинство генов, имеющих отношение к Ca^{2+}-сигналингу, не изменяли существенно уровень экспрессии (рис. 4а, б). Внесение OSRG оказывало, в целом, существенно меньший эффект на транскриптомный профиль, чем, например, время инкубирования эксплантов, соответствующее определенным стадиям развития процесса (рис. 4в). Среди генов, экспрессия которых в отсутствии OSRG существенно различалась на двух проанализированных стадиях (рис. 4в), отмечены несколько генов кальмодулинов (tr_21189, tr_867, tr_12457, tr_19028) и кальмодулин-связывающих белков (tr_5154, tr_21407, tr_9191), содержание мРНК которых снижалось на более поздней стадии. В перечне генов, повышавших экспрессию со временем культивирования, наиболее заметны гены, гомологи которых аннотированы как кодирующие белки кальциевых каналов эндоплазматического ретикулума (например, tr_16172, tr_18839, tr_28421) (рис. 4в).

При сравнении образцов, обработанных только ИУК или ИУК + OSRG, дифференциальная экспрессия ($|\log_2 FC| \geq 1$, $P \leq 0.05$) была выявлена для 11 генов (рис. 4а, б), перечисленных в таблице 2. Так, повышение экспрессии при наличии в среде OSRG отмечалось для гена, кодирующего ионный канал, относящийся к семейству каналов, регулируемых циклическими нуклеотидами (семейство GNGC) (tr_8498 гомолог AT4G30560), а снижение – для генов Na^+/Ca^{2+}-обменника (tr_16099 гомолог AT1G53210), двух Ca^{2+}-транспортирующих АТФаз (tr_19146 гомолог AT1G27770 и tr_12459 гомолог AT3G22910), и белка LIFEGUARD 4, относящегося к семейству BAX inhibitor 1 (tr_3641 гомолог AT1G03070). Экспрессия двух генов (tr_17386 и tr_2000), гомологом которых является AT5G54490, кодирующих кальций-связывающий белок PBP1 (PID-BINDING PROTEIN 1), повышалась на 24 час культивирования эксплантов. Среди дифференциально экспрессирующихся в ответ на OSRG генов отмечены также два кальций-связывающих белка, относящихся к семейству кальмодулинов (tr_18960 гомолог AT1G76650 и tr_22324 гомолог AT1G18210), и две Ca^{2+}/Кам-зависимые протеинкиназы (tr_24012 гомолог AT1G01140 и tr_5287 гомолог AT2G31500) с пониженной экспрессией в эксплантах при обработке OSRG.

ОБСУЖДЕНИЕ

Кальций является непременным ингредиентом сред, используемых для культивирования клеток и тканей, необходимым элементом для осуществления морфогенетических процессов. Характеристика эффективности формирования адвентивных корней на эксплантах гипокотилей гречихи в зависимости от времени и порядка внесения в среду культивирования ИУК и Ca^{2+} показала, что если для внесения ИУК существует временной интервал в 1–2 часа, когда отсутствие гормона не сказывается негативно на количестве корней, то для Ca^{2+} такой лаг-период отсутствует, и ион должен находиться в среде с самого начала культивирования (табл. 1). Даже 30-минутное отсутствие Ca^{2+} вызывало снижение количества корней вдвое, несмотря на экзогенно добавленный ауксин. Вероятно, повышение внутриклеточной концентрации кальция за счет его высво-

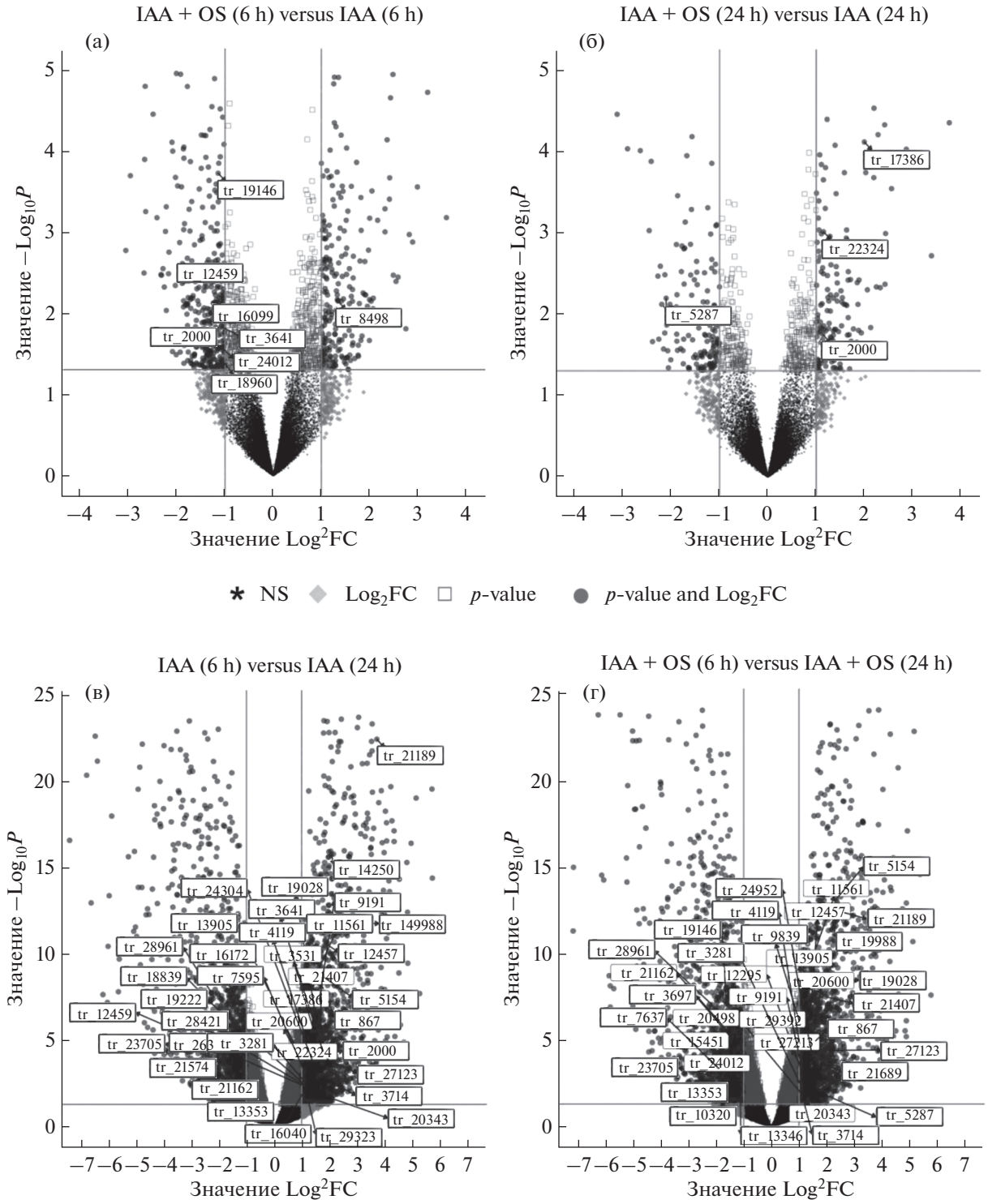

Рис. 4. Анализ различий в экспрессии генов (в виде volcano plot [Blighe]) между гипокотилями гречихи, культивируемыми на Ca^{2+}-содержащей среде в течение 6 и 24 часов в присутствии только ИУК или ИУК + OSRG. Приведены попарные сравнения, иллюстрирующие действие OSRG (а, б), или времени культивирования эксплантов (в, г).
Примечание: представлены гены, для которых различия достоверны (|fold change| ≥ 2, $P \leq 0.05$). *По горизонтальной оси* указана величина N-кратных различий уровня экспрессии, *по вертикальной оси* – достигаемый уровень значимости установленных различий экспрессии. Вертикальная и горизонтальная линии на графике соответствуют используемым порогам достоверности: 2-кратное изменение экспрессии при значении $P \leq 0.05$. В рамках обозначены гены, имеющие отношение к Ca^{2+}-сигналингу, достоверно экспрессируемые в рамках используемых порогов.

Таблица 2. Гены, имеющие отношение к Ca^{2+}-сигналингу и дифференциально экспрессируемые через 6 и/или 24 часа культивирования эксплантов гипокотилей гречихи в присутствии OSRG ($|\log_2 FC| > 1$, $P < 0.05$).

0 100 500

Name	IAA (6 h)	IAA + + OS (6 h)	IAA (24 h)	IAA + + OS (24 h)	AGI	AGI define
tr_24012	118	52	190	177	AT1G01140	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 9
tr_18960	616	268	344	172	AT1G76650	Calcium-binding protein CML38
tr_12459	1447	499	523	404	AT3G22910	Putative calcium-transporting ATPase 13, plasma membrane-type
tr_19146	155	68	237	219	AT1G27770	Calcium-transporting ATPase 1
tr_16099	279	126	172	136	AT1G53210	Sodium/calcium exchanger NCL
tr_3641	476	223	130	152	AT1G03070	Protein LIFEGUARD 4; Bax inhibitor-1 family protein
tr_8498	463	1282	774	1132	AT4G30560	Putative cyclic nucleotide-gated ion channel 9
tr_17386	125	110	31	145	AT5G54490	Calcium-binding protein PBP1
tr_22324	133	84	57	132	AT1G18210	Probable calcium-binding protein CML27
tr_2000	174	74	41	97	AT5G54490	Calcium-binding protein PBP1
tr_5287	37	15	18	2	AT2G31500	Calcium-dependent protein kinase 24

бождения из внутриклеточных хранилищ, вызываемое ауксином [12], в отсутствии экзогенно добавленного Ca^{2+} не является достаточным условием для запуска процесса образования адвентивных корней на сегментах гипокотилей гречихи (табл. 1, колонка VI). Некоторые исследователи [11, 23] считают, что экзогенный кальций играет важную роль преимущественно на более позднем этапе, а именно в процессе удлинения корня. Однако во всех предыдущих работах кальций вносили только в двух или даже одной временной точке. Длительная динамика с более узкими временными интервалами при переносе эксплантов из среды без кальция в среду, содержащую ион и наоборот (табл. 1), дали нам возможность выделить более узкие диапазоны по чувствительности эксплантов к Ca^{2+} и ИУК, что позволило сделать заключение, что эффект Ca^{2+} связан, в первую очередь, с ранними этапами формирования корней.

Чтобы осознать роль экзогенного и эндогенного пулов кальция в качестве вторичного мессенджера в процессе формирования корней, было исследовано действие веществ, влияющих на уровень внутриклеточного Ca^{2+} и его связывание с кальций-сенсорными белками (рис. 2). Снижение количества корней при применении дилтиазема и верапамила – органических блокаторов потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов в плазмалемме [24] – на 23% и 31%, соответственно, указывает на то, что приток Ca^{2+} из внеклеточного пространства является частью, но при этом не единичным путем передачи сигнала в исследуемом нами процессе. Значительное снижение количества корней под действием неомицина и рутениевого красного, на 58% и 50%, соответственно, показывает участие в процессе корнеобразования кальция, высвобождаемого из внутриклеточных хранилищ. Первый ингибитор нарушает освобождение Ca^{2+} из вакуолей через инозитольный путь, препятствуя связыванию фосфолипазы С с фосфатидилинозитол-4,5-бифосфатом, и подавляет тем самым образование вторичного мессенджера – инозитол-1,4,5–трифосфата [12]. Второй блокирует цАДФР/рианодин–чувствительные Ca^{2+}-каналы вакуолей [25], также препятствуя выходу кальция в цитоплазму. Таким образом, формирование адвентивных корней на эксплантах гипокотилей гречихи проходит при участии как внешнего, так и внутреннего пулов кальция. Более значительный эффект ингибиторов, действующих на выход кальция из внутриклеточных хранилищ, возможно, связан с их более низкой специфичностью, поскольку показано, что эти ингибиторы могут оказывать влияние и на другие Ca^{2+} каналы, например, в ЭПР и на плазмалемме [24].

Повышение концентрации кальция в клетке воспринимается различными белками-сенсорами (например, кальмодулины и кальмодулин-подобные белки), которые, связывая Ca^{2+}, инициируют сигнальные каскады для регуляции многих клеточных процессов. Антагонисты кальмодулина фенотиазинового ряда – флуфеназин и хлорпро-

мазин, для которых характерно сильное взаимодействие с кальмодулином, приводящее к подавлению его способности активировать ферменты [24], ингибировали количество корней, формирующихся на эксплантах гипокотилей гречихи (рис. 2). Подобный эффект антагонистов кальмодулина наблюдался у лишенных корней проростков бархатцев [26] и гипокотилей подсолнечника [27]. Считается, что мишенью антагонистов кальмодулина могут выступать активно делящиеся клетки, где эти ингибиторы оказывают влияние на митоз и цитокинез, приводя, таким образом, к ингибированию индукции адвентивных корней [27].

Ранее нами было показано, что в процесс формирования корней вовлечен элиситор углеводной природы – олигосахарин OSRG, который стимулирует ИУК-индуцируемый процесс корнеобразования, причем наибольший стимулирующий эффект достигался при добавлении его в начальный период культивирования эксплантов на 1–2 часа до добавления гормона. Внесение OSRG после гормона не оказывало стимулирующего эффекта [17]. Учитывая данные, полученные в предыдущей работе и в настоящем исследовании, можно заключить, что для получения максимального ответа на эффекторы Ca^{2+} должен присутствовать весь период культивирования, для ИУК необходим временной интервал от 2 до 24 часов, а для OSRG достаточно 2-часовой обработки. Таким образом и Ca^{2+}, и OSRG вовлечены в ранние этапы процесса формирования корней. Для обоих эффекторов задержка с внесением ИУК на 2–3 часа не является критичной, однако они не оказывают влияния на процесс корнеобразования при полном отсутствии гормона в среде культивирования (табл. 1, [17]).

Известно, что как ИУК [6], так и олигогалактуронидные фрагменты клеточной стенки [18] вызывают повышение уровня внутриклеточного кальция через активацию каналов, локализованных на плазмалемме. Поскольку выделенный нами олигосахарин OSRG задействован в начальных стадиях процесса корнеобразования [17], а вход Ca^{2+} в клетку является самым ранним сигналом в ответ на любые воздействия, и оба эффектора вовлечены в ИУК-индуцируемый сигнальный путь, возникло предположение, что такой ранний ответ эксплантов на OSRG, полученный в наших исследованиях, мог быть опосредован активацией Ca^{2+} каналов плазмалеммы. Однако применение блокатора кальциевых каналов – дилтиазема оказывало ингибирующее действие только на эффект, вызываемый ИУК, снижая на 25% количество корней, индуцируемое гормоном (рис. 3), а OSRG снимал негативное влияние ингибитора при одновременном внесении всех трех эффекторов. Предобработка эксплантов OSRG всегда вызывает значительную стимуляцию количества корней, даже если олигосахарин вносится вместе с дилтиаземом, свидетельствуя, что блокировка Ca^{2+} каналов, локализованных на плазматической мембране, по крайней мере, тех, которые блокируются дилтиаземом, не влияет на начальные этапы процесса корнеобразования, запускаемые OSRG. Однако на более позднем этапе, очевидно, возникает необходимость активации Ca^{2+}-каналов плазмалеммы в процессе формирования адвентивных корней, индуцируемом ИУК, поскольку при переносе эксплантов из среды, содержащей OSRG, в среду, содержащую ИУК и дилтиазем, количество корней снижалось почти вдвое (рис. 3). Таким образом, можно предположить, что потенциал-зависимые каналы плазмалеммы участвуют в ИУК-индуцируемом процессе адвентивного корнеобразования на эксплантах гипокотилей гречихи, однако эффект OSRG, предшествующий действию ИУК, вероятно, не опосредуется через регуляцию этих каналов.

Транскриптомный анализ выявил эффект OSRG на экспрессию некоторых генов, имеющих отношение к Ca^{2+}-сигнализации, который, как по числу дифференциально экспрессирующихся генов, так и по функциональному разнообразию кодируемых белков, был в большей степени выражен на ранних стадиях культивирования эксплантов (табл. 2). Если через 6 час культивирования изменялся уровень мРНК генов белков, имеющих отношение как к транспорту Ca^{2+} (Na^+/Ca^{2+}-обменник, Ca^{2+}-АТФазы, каналы, регулируемые циклическими нуклеотидами, белок, относящейся к семейству BAX inhibitor 1), так и различные Ca^{2+}-сенсорные белки (Ca^{2+}/кальмодулин-зависимые протеинкиназы, кальмодулин-связывающие белки), то через 24 час культивирования OSRG оказывал влияние только на экспрессию генов Ca^{2+}-сенсорных белков. С помощью ингибиторного анализа мы показали, что эффект OSRG, вероятно, не реализуется через поступление внешнего кальция через потенциал-зависимые каналы плазмалеммы, однако то, что на 6 час культивирования OSRG оказывает влияние на экспрессию ряда генов транспортеров кальция, отличающихся и по локализации, и по направлению передвижения кальция, говорит о том, что нельзя полностью исключить возможность его участия в изменении внутриклеточного содержания кальция.

OSRG оказывает влияние на экспрессию нескольких Ca^{2+}-зависимых протеинкиназ, одна из которых относится к классу протеинкиназ, способных образовывать комплекс с кальциневрин B-подобным белком (tr_24012 гомолог AT1G01140). Этот способ сложной и динамической регуляции Ca^{2+}-сигнальных путей показан только у наземных растений. С помощью попарных комбинаций различных кальциневринов и специфически связывающихся с ними Ca^{2+}-зависимых протеинки-

наз создается разветвленная сигнальная сеть [28]. Показано, что отдельные представители этого семейства протеинкиназ регулируют архитектуру корневой системы в ответ на внешнее воздействие [29], но участие этого класса протеинкиназ в процессе формирования адвентивных корней не изучалось.

На 24 час культивирования OSRG повышал экспрессию двух генов (tr_l7386 и tr_2000), гомологом которых является AT5G54490, кодирующий кальций-связывающий белок PBP1 (PID-BINDING PROTEIN 1) (табл. 2). Известно, что в ответ на изменение уровня цитозольного кальция белки PBP1 регулируют активность PID-киназы (серин/треонин протеинкиназа PINOID), которая участвует в тонкой настройке полярного транспорта ауксина во время формирования органов растений, в том числе и латеральных корней в ответ на локальные концентрации ауксина [30].

Таким образом, OSRG, как и Ca^{2+}, вовлечен в регуляцию ответов на ауксин в процессе формирования адвентивных корней и наши результаты представляют собой попытку связать две сигнальные системы: универсальную, опосредуемую Ca^{2+}, и мало изученную сигнальную систему с участием биологически активных фрагментов полисахаридов клеточной стенки. На основании полученных данных мы можем заключить, что на начальных стадиях адвентивного корнеобразования OSRG может быть задействован в создании определенных профилей колебания внутриклеточного кальция, которые являются индивидуальными при действии различных эффекторов, включая гормональный сигнал [5]. А на более позднем этапе, через повышение экспрессии генов белков PBP1, OSRG способствует усилению полярного транспорта ауксина и изменению программы развития, связанной со следующим этапом формирования корня. В целом, можно заключить, что олигосахарин OSRG может выступать в роли тонкого регулятора адвентивного корнеобразования, протекающего при участии ИУК, и опосредованного многоплановым участием Ca^{2+} в разнообразных клеточных процессах.

Авторы выражают благодарность старшему научному сотруднику отдела физиологии и молекулярной биологии растений КИББ ФИЦ КазНЦ РАН Мокшиной Наталье Евгеньевне за помощь в обсуждении результатов.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета в рамках темы государственного задания Казанского института биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН и при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-04-01539).

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов. Данная статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Verstraeten I., Schotte S., Geelen D.* Hypocotyl adventitious root organogenesis differs from lateral root development // Front. Plant Sci. 2014. V. 5. Article 495. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00495
2. *Li K., Liang Y., Xing L., Mao L., Liu Z., Dong F., Meng Y., Han M., Zhao C., Bao L., Zhang D.* Transcriptome analysis reveals multiple hormones, wounding and sugar signaling pathways mediate adventitious root formation in apple rootstock // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. Article 2201. https://doi.org/10.3390/ijms19082201
3. *Pagnussat G. C., Lanteri M. L., Lombardo M. C.* Nitric oxide mediates the indole acid induction activation of a mitogen activated protein kinase cascade involved in adventitious root development // Plant Physiol. 2004. V. 135. P. 279. https://doi.org/10.1104/pp.103.038554
4. *Li S.W., Xue L.G.* The interaction between H_2O_2 and NO, Ca^{2+}, cGMP, and MAPKs during adventitious rooting in mung bean seedlings // In Vitro Cell DevBiol – Plant. 2010. V. 46. P. 142. https://doi.org/10.1007/s11627-009-9275-x
5. *Медведев С.С.* Принципы формирования и распространения кальциевого сигнала в растительной клетке // Физиология растений. 2018. Т. 65. С. 403. https://doi.org/10.1134/S0015330318060106
6. *Shishova M., Lindberg S.* Auxin induces rapid increase of Ca^{2+} concentration in the cytosol of wheat leaf protoplasts // J. Plant Physiol. 2004. V. 161. P. 937. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2003.12.005
7. *Zhang J., Vanneste S., Brewer P.B., Michniewicz M., Grones P., Kleine-Vehn J., Lofke C., Teichmann T., Bielach A., Cannoot B., Hoyerova K., Chen X., Xue H-W., Benkova E., Zazımalova E., Friml J.* Inositol trisphosphate-induced Ca^{2+} signaling modulates auxin transport and PIN polarity // Dev. Cell. 2011. V. 20. P. 855. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.05.013
8. *Dindas J., Scherzer S., RoelfsemaM.R.G., von Meyer K., Müller H.M., Al-Rasheid K.A.S., Palme K., Dietrich P., Becker D., Bennett M.J., Hedrich R.* AUX1-mediated root hair auxin influx governs SCF TIR1/AFB-type Ca^{2+} signaling // Nat. Commun. 2018. V. 9. P. 1174. https://doi.org/10.1038/s41467-018-03582-5
9. *Lee J.S., Mulkey T.J., Evans M.L.* Inhibition of polar calcium movement and gravitropism in roots treated with auxin-transport inhibitors // Planta. 1984. V. 160. P. 536. https://doi.org/10.1007/BF00411142
10. *Reddy A.S.N., Koshiba T., Theologis A., Poovaiah B.W.* The effect of calcium antagonists on auxin-induced elongation and on the expression of two auxin-regulated genes in pea epicotyls // Plant Cell Physiol. 1988. V. 29. P. 1165. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077618
11. *Bellamine J., Penel C., Greppin H., Gaspar T.* Confirmation of the role of auxin and calcium in the late phases

of adventitious root formation // Plant Growth Regul. 1998. V. 26. P. 191.
https://doi.org/10.1023/A:1006182801823

12. *Lanteri M.L., Pagnussat G.C., Lamattina L.* Calcium and calcium-dependent protein kinases are involved in nitric oxide and auxin-induced adventitious root formation in cucumber // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. P. 1341.
https://doi.org/10.1093/jxb/erj109
13. *Bellincampi D., Salvi G., De Lorenzo G., Cervone F., Marfa V., Eberhard S., Darvill A., Albersheim P.* Oligogalacturonides inhibit the formation of roots on tobacco explants // Plant J. 1993. V. 4. P. 207.
https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1993.04010207.x
14. *Zabotina O.A., Gurjanov O.P., Ibragimova N.N., Ayupova D.A., LozovayaV.V.* Rhizogenesis in buckwheat thin-cell-layer explants: effect of plant oligosaccharides // Plant Sci. 1998. V. 135. P. 195.
https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00022-3
15. *Auxtova-Samajova O., Liskova D., Kakoniova D., Kubackova M., Karacsonyi S., Bilisics L.* Inhibition of auxin stimulated short-term elongation growth of pea stem segments by galactoglucomannan-derived oligosaccharides // J. Plant Physiol. 1996. V. 147. P. 611.
https://doi.org/10.1016/S0176-1617(96)80054-X
16. *Navazio L., Moscatiello R., Bellincampi D., Baldan B., Meggio F., Brini M., Bowler C., Mariani P.* The role of calcium in oligogalacturonide-activated signaling in soybean cells // Planta. 2002. V. 215. P. 596.
https://doi.org/10.1007/s00425-002-0776-7
17. *Ларская И.А., Барышева Т.С., Заботин А.И., Горшкова Т.А.* Характер участия олигосахарина OSRG в ИУК-индуцируемом формировании адвентивных корней // Физиология растений. 2015. Т. 62. С. 186.
https://doi.org/10.7868/S0015330315020128
18. *Vanneste S., Friml J.* Calcium: the missing link in auxin action // Plants. 2013. V. 2. P. 650.
https://doi.org/10.3390/plants2040650
19. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473.
https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
20. *Larskaya I., Gorshkov O., Mokshina N., Trofimova O., Mikshina P., Klepikova A., Gogoleva N., Gorshkova N.* Stimulation of adventitious root formation by the oligosaccharin OSRG at the transcriptome level // Plant Signaling Behav. 2019. e1703503.
https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1703503
21. *Love M.I., Huber W., Anders S.* Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 // Genome Biology. 2014. V. 15. P. 550.
https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8
22. *Blighe K., Rana S., Lewis M.* Enhanced Volcano: Publication-ready volcano plots with enhanced colouring and labeling; https://github.com/kevinblighe
23. *Capitani F., Altamura M.M.* Exogenous calcium enhances the formation of vegetative buds, flowers and roots in tobacco pith explants cultured in the absence of exogenous hormones // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2004. V. 77. P. 1.
https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000016608.08095.0f
24. *De Vriese K., Costa A., Beeckman T., Vanneste S.* Pharmacological strategies for manipulating plant Ca^{2+}signalling // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. P. 1506.
https://doi.org/10.3390/ijms19051506
25. *Navazio L., Mariani P., Sanders D.* Mobilization of Ca^{2+} by cyclic ADP-ribose from theendoplasmic reticulum of cauliflower florets // Plant Physiol. 2001. V. 125. P. 2129.
https://doi.org/10.1104/pp.125.4.2129
26. *Liao W.-B., Zhang M.-L., Huang G.-B., Yu H.-X.* Ca^{2+} and CaM are involved in NO- and H_2O_2-induced adventitious root development in marigold // J. Plant Growth Regul. 2012. V. 31. P. 253.
https://doi.org/10.1007/s00344-011-9235-7
27. *Kalra G., Bhatia S.C.* Auxin – calcium interaction in adventitious root formation in the hypocotyl explants of sunflower (*Helianthus annuus* L.) // J. Plant Biochem. Biotechnol. 1998. V. 7. P. 107.
https://doi.org/10.1007/BF03263045
28. *Mao J., Manik S., Shi S., Chao J., Jin Y., Wang Q., Liu H.* Mechanisms and physiological roles of the CBL-CIPK networking system in *Arabidopsis thaliana* // Genes. 2016. V. 7. P. 62.
https://doi.org/10.3390/genes7090062
29. *Xuan Y.H., Kumar V., Han X., Kim S.H., Jeong J.H., Kim C.M., Gao Y., Han C.-D. CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 9* regulates ammonium-dependent root growth downstream of *IDD10* in rice (*Oryza sativa*) // Annals of Botany. 2019. mcy242.
https://doi.org/10.1093/aob/mcy242
30. *Benjamins R., Quint A., Weijers D., Hooykaas P.J.J., Offringa R.* The PINOID protein kinase regulates organ development in *Arabidopsis* by enhancing polar auxin transport // Development. 2001. V. 128. P. 4057.