

УДК 581.1

## ЭТИЛЕН СОПРОВОЖДАЕТ ПРОЛИФЕРАЦИЮ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ ИЛИ УЧАСТВУЕТ В ЕЕ РЕГУЛЯЦИИ?

© 2015 г. А. А. Фоменков\*, А. В. Носов\*, В. Ю. Ракитин\*, Е. С. Суханова\*<sup>\*\*\*</sup>, А. С. Мамаева\*, Г. И. Соболева\*, А. М. Носов\*<sup>\*\*\*</sup>, Г. В. Новикова\*

\*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва

\*\*Биологический факультет Московского государственного университета  
им. М.В. Ломоносова, Москва

Поступила в редакцию 19.05.2015 г.

Этилен — один из пяти классических фитогормонов растений — участвует в регуляции многих физиологических процессов. Однако существуют противоречивые сведения о влиянии этилена на рост и деление клеток, хотя показано, что в культуральных сосудах содержание этилена увеличивается до нескольких десятков мкл/л, а продукция этилена связана с периодами активного роста клеток *in vitro*. Нами выявлена существенная корреляция ( $r = 0.96$ ) между продукцией этилена и удельной скоростью увеличения сухого веса в суспензионных культурах клеток *Ajuga turkestanica*, гетеротрофного и миксотрофного штаммов *Arabidopsis thaliana*, *Beta vulgaris*, *Euonymus maximoviczianus*, *Medicago sativa*, *Panax ginseng*, *Triticum timopheevii*. Для гетеротрофной культуры клеток *A. thaliana* в логарифмической фазе и в фазе замедления роста показано совпадение максимумов и общего хода кривых, отражающих процессы динамики продукции этилена, доли S-фазных клеток и удельной скорости роста числа клеток. Предобработка исходного инокулята клеток 100 мкл/л этилена приводила через 3 ч их культивирования в свежей питательной среде к удвоению количества S-фазных клеток. Установлено, что экзогенный этилен влияет на количество S-фазных клеток лишь тогда, когда продукция эндогенного этилена мала.

*Ключевые слова:* *Arabidopsis thaliana* — S-фаза — клеточный цикл — культура клеток — пролиферация клеток — рост — продукция этилена

DOI: 10.7868/S0015330315060056

### ВВЕДЕНИЕ

С начала XX века, когда впервые было показано нарушение нормального роста растений под действием чрезвычайно низких концентраций газообразного этилена [1], установлен широкий спектр его влияния на растения. Этилен — один из пяти классических фитогормонов — регулирует выход семян из покоя и их прорастание, растяжение клеток, формирование корневых волосков, рост репродуктивных органов и определение пола цветков, старение и опадение листьев и цветков, созревание и опадение плодов, ответы на патогены и абиотические стрессовые факторы [2, 3].

*Сокращения:* КЦ — клеточный цикл; среда SH — среда Schenk и Hildebrandt; EdU — 5-этинил-2'-дезоксидеоксиридин (от 5-ethyl-2'-deoxyuridine); ERF — отвечающий на этилен фактор транскрипции (от ethylene response factors); PBS — фосфатно-солевой буфер (от phosphate buffered saline).

*Адрес для корреспонденции:* Носов Александр Владимирович. 127276 Москва, Ботаническая ул., 35. Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН. Факс: 07 (499) 977-80-18; электронная почта: alexv.nosov@mail.ru

Молекулярные механизмы действия этилена были и остаются предметом многих исследований в последние три десятилетия. Основопологающие сведения получены благодаря масштабным генетическим работам с использованием мутантов модельного растения *Arabidopsis thaliana* [4, 5]. Идентифицированные ключевые компоненты, участвующие в восприятии и передаче сигнала этилена, позволили предложить “линейный” путь, в соответствии с которым связывание этилена с рецепторными гистидинкиназами изменяет их конформацию, инактивирует комплексы рецепторов с CTR1 (Сер/Тре протеинкиназа, подобная протеинкиназам Raf-семейства). Это приводит к дефосфорилированию белка EIN2 (белка подобного Nrapm металл-ионному транспортеру), отщеплению его C-концевого домена, который переносится в ядро и инициирует транскрипционный ответ этилен-зависимых генов посредством последовательной активации факто-

ров транскрипции семейств EIN3/EIL1 и ERF [3, 6, 7].

Однако современная картина сигнального пути этилена приобрела важные элементы: интервенцию на разных участках модулей митоген-активируемых протеинкиназ, вовлеченность протеасом-зависимой деградации белков сигнального пути и регулируемая этиленом представленность комплексов рецепторов с CTR1 [8–11]. Это определенно указывает на важность для растений тонкой настройки восприятия и передачи сигнала этилена и наличие альтернативных сигнальных путей, что стимулирует дальнейшие исследования в данной области.

Требуют решения и вопросы о роли этилена в регуляции роста и деления клеток. Несмотря на то, что давно сформировалось представление об этилене как ингибиторе растяжения клеток, существует множество примеров стимуляции этиленом роста, что, как правило, определяется концентрацией фитогормона, видом растения и внешними условиями [12, 13].

Нет однозначного понимания значения этилена в контроле пролиферации клеток. С одной стороны, показано ингибирование этиленом репликации ядерной ДНК и деления клеток в проростках гороха [14], а также индукция запрограммированной гибели клеток в определенные периоды клеточного цикла (КЦ) [15]. С другой стороны, этилен индуцирует эндоредупликацию [16], стимулирует деление ствольных клеток покоящегося центра меристемы корней *Arabidopsis* [17], камбиальных клеток тополя [18] и клеток покоящегося центра меристемы корней кукурузы после удаления кончика корня [19].

Безусловно, для исследования влияния каких-либо эффекторов на КЦ растений, в том числе для решения вопроса о месте этилена в регуляции клеточных делений и молекулярных механизмах его взаимодействия с известными компонентами управления КЦ, хорошо подходят экспериментальные объекты с интенсивной пролиферацией клеток, лишенные сложных межтканевых взаимодействий и комплексных онтогенетических программ. Этим условиям удовлетворяют активно растущие суспензионные культуры клеток, которые широко применяются в экспериментальной биологии растений [20].

Важно отметить, что культивируемые *in vitro* клетки и ткани, в зависимости от вида растения и условий, способны продуцировать этилен, который может накапливаться в культуральных сосудах в концентрации до нескольких десятков мкл/л [21, 22], а физиологические эффекты этилена обнаруживаются и при меньших на два–три порядка концентрациях [1, 2]. Более того, показано, что продукция этилена связана с периодами активного роста культивируемых клеток [21, 23].

Следовательно, высокий уровень этилена должен быть совместим с пролиферацией клеток *in vitro*. Однако результаты ранних исследований и выводы авторов неоднозначны: от аргументов в пользу того, что этилен является побочным продуктом быстрого роста и не участвует в инициации и поддержании деления клеток растений *in vitro*, до результатов о разнонаправленном влиянии экзогенного этилена на рост каллусных и суспензионных культур или отсутствии эффектов фитогормона даже при чрезвычайно высокой (~20 мМ) концентрации [21–23].

Таким образом, до сих пор остается открытым вопрос – какова роль этилена в регуляции пролиферации клеток растений *in vivo* и *in vitro*? Все это побудило нас вновь вернуться к выяснению связей между ростовыми параметрами культивируемых клеток и продукцией этилена и исследовать влияние экзогенного этилена на количество клеток, находящихся в периоде репликации ядерной ДНК как показателя активного прохождения КЦ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объектами исследования** служили суспензионные культуры клеток из Всероссийской коллекции культивируемых клеток высших растений: (1) *Beta vulgaris* L., штамм 2n; (2) *Triticum timopheevii* (Zhuk.) Zhuk.; (3) *Panax ginseng* С.А. Mey., штамм PgL1 NB; (4) *Medicago sativa* L.; (5) *Dioscorea deltoidea* Wall., штамм ДМ-05, линия 3; (6) *Ajuga turkestanica* (Regel) Briq., линия 1. Кроме того в работе использовали авторские (А.В. Носова и А.А. Фоменкова) штаммы: (7) гетеротрофный штамм *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. дикого типа (экотип Columbia, Col-0) [24]; (8) миксотрофный штамм *A. thaliana* и (9) суспензионную культуру клеток *Euonymus maximoviczianus* Prokh. Культивируемые клетки штаммов 1, 2, 7–9 выращивали в среде Schenk и Hildebrandt (SH) с 3% сахарозы (1.5% для штамма 8), 1 мг/л 2,4-Д и 0.1 мг/л кинетина; культуры клеток штаммов 3–6 выращивали в среде МС с 3% сахарозы, 1 мг/л 2,4-Д и 0.1 мг/л кинетина (для штаммов 4, 5), 2 мг/л НУК и 1 мг/л БАП (3), 1 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л ИУК и 0.2 мг/л БАП (штамм 6). Клетки культивировали в стеклянных колбах объемом 250–300 мл, закрытых алюминиевой фольгой и крафт-бумагой (штамм 4 под ватными пробками), в темноте (штамм 8 постоянно освещали люминесцентными лампами с интенсивностью 200 мкмоль фотонов/(м<sup>2</sup> с)) при температуре 26°C и постоянном перемешивании (120 качаний/мин). Период субкультивирования – 10 дней для штаммов 7, 8; 14 дней для штаммов 1–6 и 20 дней для штамма 9.

**Для определения параметров роста** клеток суспензий в течение субкультивирования периодически выбирали по три колбы, в которых опреде-

ляли сырой вес клеток и после высушивания при 37°C в течение 3 суток – сухой вес.

**Число клеток** гетеротрофного штамма *A. thaliana* оценивали по числу протопластов, для выделения которых смешивали равные объемы суспензии клеток и раствора, содержавшего макросоли SH, 0.8 М сорбита, 8 мМ CaCl<sub>2</sub>, 25 мМ Mes/КОН (рН 5.7), 2% целлюлазы Onozuka R10 (“Kinki Yakult”, Япония), 0.3% пектиназы Macerozyme R10 (“Kinki Yakult”), 0.8% гемицеллюлазы Driselase (“Fluka”, США). Протопласты выделяли при 26°C на шейкере (100 качаний/мин) в течение 1.0–1.5 ч. Число протопластов подсчитывали в камере Фукса–Розенталя.

**Жизнеспособность** оценивали по числу клеток, неокрашенных 0.02% водным раствором Erythrosin B (“Sigma-Aldrich”, США).

**Количество культивируемых клеток *A. thaliana*, находящихся в S-фазе КЦ**, определяли по включению в реплицирующуюся ДНК аналога тимидина – 5-этилил-2'-дезоксидеозина (EdU, “Invitrogen, Life Technologies”, США) по методике, описанной нами ранее [25]. В течение стандартного цикла выращивания или по окончании обработки экзогенным этиленом продолжительностью ≥1 суток отбирали пробы клеток (5–6 мл), добавляли EdU в концентрации 20 мкМ и инкубировали 1 ч в темноте при 26°C на качалке (для часовых экспозиций с этиленом схема инкубации с EdU представлена ниже). Затем добавляли 200 мкМ тимидина для остановки включения EdU. Клетки фиксировали в 4% формалине в фосфатно-солевом буфере (PBS) с 0.1% Triton X-100, либо из клеток выделяли протопласты (см. описание определения числа клеток), которые фиксировали холодным метанолом. Включение EdU выявляли при помощи реакции с азидом Alexa Fluor 488, ядра окрашивали 100 нг/мл DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол), готовили временные препараты и анализировали их под флуоресцентным микроскопом Axio Imager Z2 (“Zeiss”, Германия) [25]. Изображения обрабатывали в программе AxioVision 4.8. Суммарное количество проанализированных ядер на нескольких препаратах было не менее 5000 при количестве S-фазных клеток <3% и около 2000 при количестве S-фазных клеток >3%.

**Получение этилена, определение содержания этилена, двуокиси углерода и кислорода** проводили согласно методам, описанным ранее [26]. Этилен получали при разложении 2-хлорэтилфосфоновой кислоты в щелочных условиях. Количественное определение этилена проводили в газовом хроматографе Цвет 106 (Россия) с пламенно-ионизационным детектором. Концентрирование углеводов проводили в колонке (80–100 меш, 70 × 4 мм) Porapak N (“Supelko”, США) при –30°C. После десорбции при 50°C этилен

определяли в колонке (80–100 меш, 3 м × 2 мм) Porapak N. Содержание двуокиси углерода и кислорода контролировали методом газоадсорбционной хроматографии. Применение концентрирующей системы позволяет значительно повысить чувствительность метода, поскольку можно использовать всю газовую фазу флакона, а также сократить время инкубации клеток под газонепроницаемыми пробками и тем самым сохранить необходимый уровень кислорода для жизни клеток и активности оксидазы 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты.

**Для оценки скорости образования этилена** в разные сроки субкультивирования из культуральных колб отбирали по 3–5 мл суспензии клеток и переносили в стеклянные 15-миллилитровые флаконы. Флаконы с клетками помещали в термостатируемые условия (26°C) на качалку (100 качаний/мин) на 10 мин для проветривания, затем герметично закрывали пробками из самоуплотняющейся резины (Suba-Seal septa red rubber, “Sigma-Aldrich”) и инкубировали 0.5–1.0 ч при температуре 26°C на шейкере в темноте. Так же поступали с флаконами со средой без клеток, газовую фазу которых использовали в качестве контроля на содержание этилена в воздухе. Затем из флаконов шприцем отбирали 1–2 мл газовой среды для анализа O<sub>2</sub> и CO<sub>2</sub>, а весь оставшийся газ – для анализа этилена. Следует подчеркнуть важность соблюдения температурного режима и условий перемешивания в ходе всех манипуляций с клетками, поскольку от этих параметров зависит продукция этилена. Для определения состава газовой среды в колбах с культивируемыми клетками шприцем с длинной иглой прокалывали закрывающую колбы фольгу и отбирали пробы газов (10 мл), аликвоты (1–2 мл) использовали для анализа. Состав газов также контролировали в газовых колоколах и герметичных контейнерах, в которых культивировали клетки в атмосфере с экзогенным этиленом.

**Культивирование клеток *A. thaliana* с экзогенным этиленом.** При экспозиции клеток с этиленом более 2 суток суспензию выращивали в 100-миллилитровых колбах Эрленмейера. В 25 мл среды SH вносили 0.5 мл суспензии клеток. Колбы закрывали одним слоем стерильной плотной хроматографической бумаги, помещали на столик из органического стекла, закрывали 20-литровым газовым колоколом и герметизировали. Через тубинг, присоединенный к выходящему из столика штуцеру, в колокол вводили этилен (20 мкл/л или 100 мкл/л). Контрольный колокол содержал воздух. Всю конструкцию помещали на качалку (26°C, темнота). При экспозиции клеток с этиленом в течение 2 суток использовали 6-литровые газовые колокола. Суточные экспозиции проводили в 2.6-литровых полипропиленовых контейнерах, снабженных тубингами и герме-

Содержание этилена в газовой фазе колб с суспензионными культурами клеток

Суспензионная культура клеток	Содержание этилена, нл/л	$\mu_{\max}$ , сутки <sup>-1</sup>
<i>Beta vulgaris</i>	73	0.47
<i>Triticum timopheevii</i>	83	0.30
<i>Panax ginseng</i>	10	0.16
<i>Euonymus maximoviczianus</i>	42	0.09
<i>Dioscorea deltoidea</i>	31	0.18
<i>Arabidopsis thaliana</i> (гетеротрофный штамм)	3420	0.86
<i>A. thaliana</i> (миксотрофный штамм)	2970	0.69

Примечание. Содержание этилена в воздухе – 5 нл/л.  $\mu_{\max}$ , сутки<sup>-1</sup> – максимальная удельная скорость роста по сухому весу.

тичными крышками с силиконовым уплотнением. Суспензию клеток в этом случае выращивали в широких 100-миллилитровых стаканах, закрытых плотной хроматографической бумагой.

**В экспериментах с преобработкой гетеротрофной культуры клеток этиленом перед их инокуляцией** в свежую среду 10-дневную суспензию в 100-миллилитровых стаканах помещали в контейнеры рядом с широким кристаллизатором, содержащим 50 мл среды SH с 20 мкМ EdU. Контейнер закрывали и вводили этилен (100 мкл/л). Через 5 ч контейнер открывали, быстро перенесли 1 мл 10-дневной суспензии в кристаллизатор со средой, закрывали и снова вводили этилен. Контейнер помещали на качалку на 3 ч (26°C, темнота). Параллельно в колбы объемом 250 мл с 50 мл среды SH и 20 мкМ EdU вносили 1 мл суспензии клеток и культивировали в стандартных условиях. В течение 4 ч определяли продукцию этилена клетками и фиксировали материал для определения количества S-фазных клеток.

На рисунках представлены средние арифметические значения из трех биологических повторностей и их стандартные ошибки.

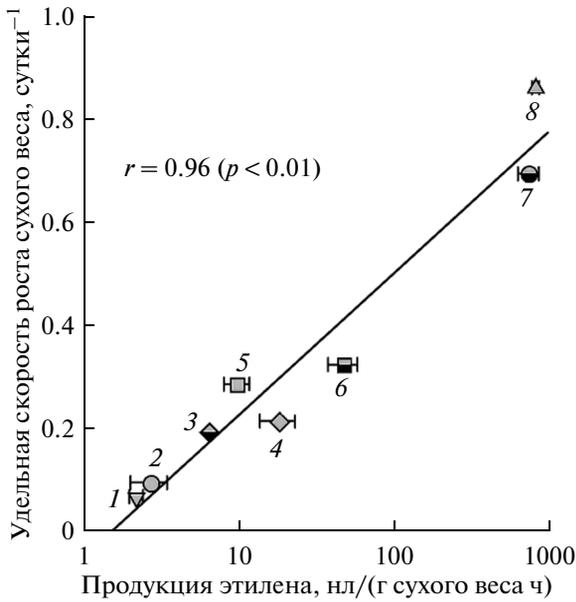
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе субкультивирования суспензионные культуры клеток всех использованных в работе штаммов выделяли этилен, который накапливался в газовой фазе колб (таблица). Отметим, что содержание этилена было на 1–3 порядка выше, чем в воздухе и значительно варьировало для разных культур клеток. Авторы других исследований также наблюдали большое разнообразие в содержании этилена в зависимости от вида культивируемых клеток и тканей и отмечали, что нередко более интенсивная продукция этилена была связана с периодами активного роста [21–23]. Однако, опираясь на имеющиеся в литературе данные, выявить корреляцию между скоростью роста культивируемых клеток и продукцией этилена невозможно из-за отсутствия ростовых ха-

рактеристик и особенностей методик определения выделения этилена. Безусловно, содержание этилена в газовой фазе должно зависеть от его продукции культивируемыми клетками, и если выделение этилена связано с интенсивностью роста, то должно зависеть и от интенсивности роста. Как видно из таблицы, самое большое содержание этилена было выявлено в газовой фазе суспензионных культур *A. thaliana*, которые характеризовались наибольшей интенсивностью роста. Тем не менее, содержание этилена в газовой фазе также зависело от плотности закрывания колб, количества биомассы, объема среды и ее состава.

Поэтому нам представляется более корректным рассмотреть возможную связь продукции этилена культивируемыми клетками и удельной скорости роста. При этом правильнее использовать не максимальную удельную скорость, а локальную, относящуюся по интервалу времени к моменту определения продукции этилена. Продукцию этилена также необходимо выражать в расчете на единицу сухого веса, поскольку культуры различаются по содержанию воды. Полученные данные показали, что вне зависимости от штамма клеток наблюдается существенная корреляция между продукцией этилена и удельной скоростью увеличения сухого веса (рис. 1). Однако выявленная зависимость не позволяет однозначно говорить о причинно-следственных отношениях между параметрами. Для более детального анализа мы выбрали наиболее быстро растущую гетеротрофную суспензионную культуру клеток *A. thaliana*. В течение цикла выращивания определяли ростовые параметры, продукцию этилена и количество клеток, находящихся в периоде репликации ядерной ДНК (S-фазные клетки).

Сразу же после инокуляции клеток в свежую питательную среду резко активировалась продукция этилена (рис. 2, кривая 1), потом она снижалась, возрастала в первые сутки и достигала максимума в середине логарифмической фазы роста (72 ч). Важно отметить, что с момента начала логарифмической фазы роста (48 ч) и далее по цик-



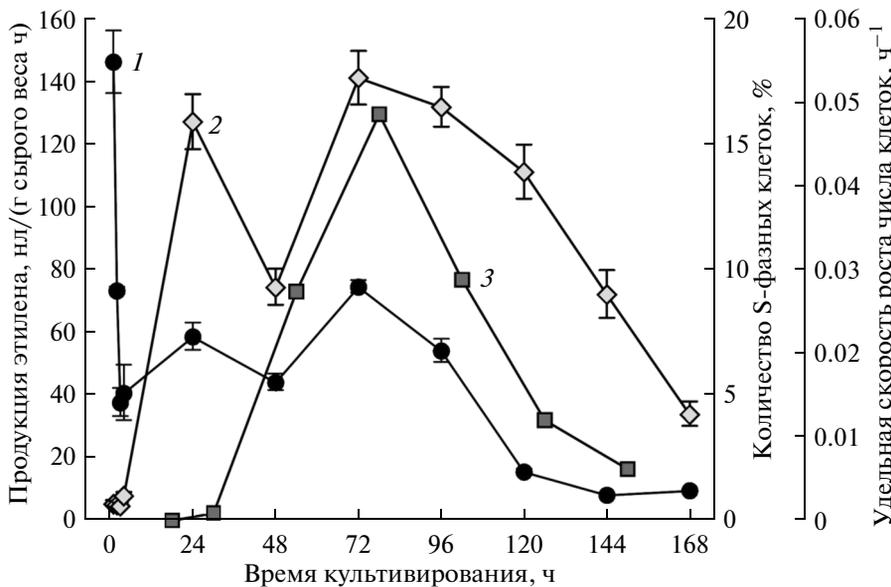
**Рис. 1.** Зависимость между удельной скоростью роста сухого веса и продукцией этилена для суспензионных культур клеток.

1 – *Panax ginseng*, 2 – *Euonymus maximoviczianus*, 3 – *Beta vulgaris*, 4 – *Medicago sativa*, 5 – *Triticum timopheevii*, 6 – *Ajuga turkestanica*, 7 – *Arabidopsis thaliana* (миксотрофный штамм), 8 – *A. thaliana* (гетеротрофный штамм). Абсцисса представлена в логарифмическом масштабе.

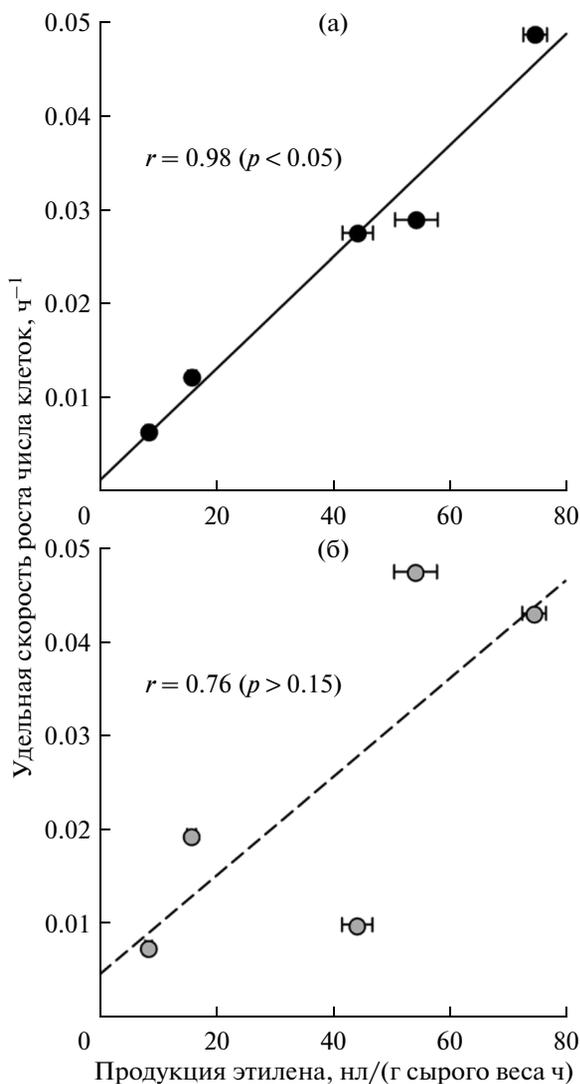
лу выращивания совпадали максимумы и общий ход кривых, отражающих динамику продукции этилена, доли S-фазных клеток и удельной скорости увеличения числа клеток (рис. 2, кривые 1–3).

Первый пик S-фазных клеток, в процентном отношении сравнимый с пиком на 72 ч, приходился на первые сутки, когда абсолютное число клеток практически не изменилось с момента их инокуляции в свежую питательную среду. Этот пик отражает хорошо известный феномен частичной синхронизации КЦ в начале субкультивирования, когда клетки получают новую порцию углеводов, нитратов и фосфатов, что давно нашло реализацию в схемах синхронизации КЦ путем удаления каких-либо компонентов питания с последующим их добавлением [27]. Отметим факт совпадения первого пика S-фазных клеток с подъемом продукции этилена в точке 24 ч, что может указывать на участие этилена в реализации событий частичной синхронизации КЦ в начале субкультивирования. Так, известно, что углеводы стимулируют синтез этилена и, например, максимум его продукции высечками из листьев табака (при добавлении сахарозы в присутствии ауксина) приходится на 24 ч [28].

Вернемся к логарифмической фазе роста. Исходя из максимальной удельной скорости увеличения числа клеток ( $\mu_{max} = 0.048 \text{ ч}^{-1}$ ), время их удвоения равно 14.4 ч. Если предположить, что этилен является триггером, а не следствием пролиферации клеток, то при построении графика в координатах продукция этилена против удельной скорости роста числа клеток последний параметр следует вычислять для 12-часового интервала после точки определения продукции этилена. Действительно, в таком случае корреляция между выделением этилена и удельной скоростью роста числа клеток весьма высока (рис. 3а). Если значе-



**Рис. 2.** Динамика продукции этилена (1), количества S-фазных клеток (2) и удельной скорости роста числа клеток (3) в цикле выращивания гетеротрофной суспензионной культуры клеток *A. thaliana*.

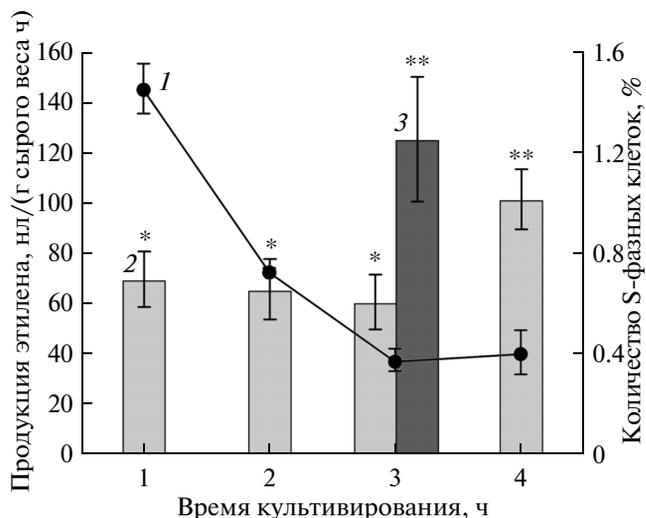


**Рис. 3.** Зависимость между удельной скоростью роста числа клеток и продукцией этилена в гетеротрофной суспензионной культуре клеток *A. thaliana*.

а – удельная скорость роста числа клеток рассчитана для 12-часового интервала после точки определения продукции этилена; б – удельная скорость роста числа клеток рассчитана для 12-часового интервала, предворяющего точку определения продукции этилена.

ние  $\mu$  вычислять для 12-часового отрезка времени, предворяющего точку определения продукции этилена, то корреляция “рассыпается” (рис. 3б). Это косвенно говорит о том, что синтез этилена предшествует пролиферации клеток.

Теперь обратимся к началу цикла выращивания. Как уже отмечалось, после всплеска продукции этилена в первый час культивирования наблюдали ее быстрый спад (рис. 4, кривая 1). При этом к 4 ч начинало увеличиваться количество S-фазных клеток (рис. 4, колонки 2). Причиной активации выделения этилена могут быть как

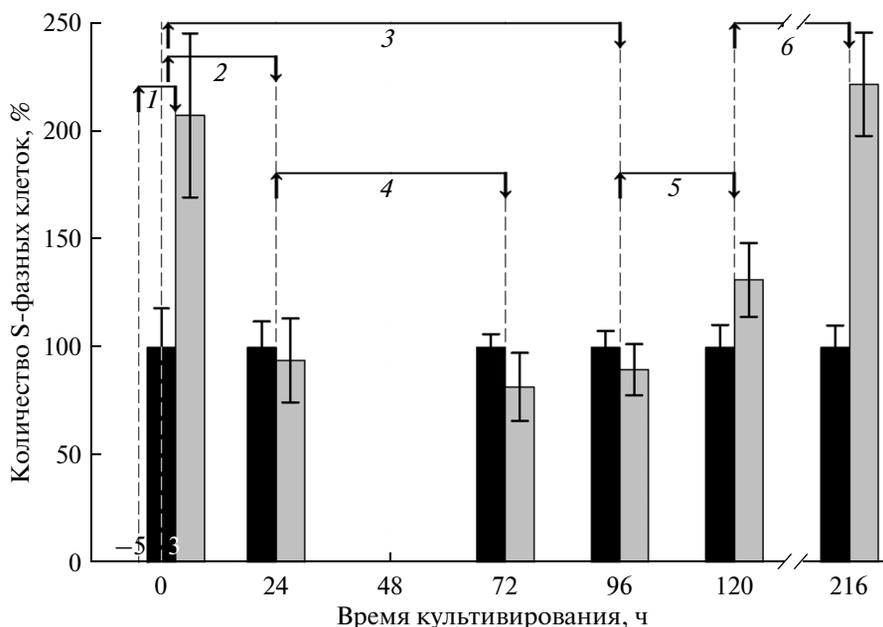


**Рис. 4.** Динамика продукции этилена и количества S-фазных клеток в первые часы после инокуляции клеток гетеротрофного штамма *A. thaliana* в свежую питательную среду.

1 – продукция этилена; 2 – количество S-фазных клеток в контрольном варианте (воздух); 3 – количество S-фазных клеток после предобработки инокулята этиленом (100 мкл/л) в течение 5 ч и культивирования клеток после инокуляции в атмосфере со 100 мкл/л этилена. Одинаковое число снежинок означает отсутствие достоверных различий при  $p < 0.05$ .

физические манипуляции с клетками (“пипетирование”), так и смена среды, приводящая к изменению pH, осмолярности и ионного состава. Известно, что в ответ на механическое повреждение в растениях в течение нескольких минут увеличивается синтез этилена [29]. В случае с суспензией клеток *A. thaliana* такой кратковременный, но высокий уровень этилена может быть сигналом к переходу клеток из G1-фазы КЦ в S-фазу. Недавно показано, что удаление верхушечной меристемы главного побега у *A. thaliana*, безусловно приводящее к продукции “раневого” этилена, быстро активировало экспрессию гена фактора транскрипции ERF114 (он же EBE или ERF BUD ENHANCER), который активирует транскрипцию гена циклина D-типа (*CYCD3;3*) – обязательного участника регуляции перехода G1/S КЦ [30]. Возможно, такая цепь событий наблюдается и в случае инокуляции клеток в свежую среду.

Предположим, этилен является одним из факторов, участвующих в регуляции перехода клеток из G1-фазы КЦ в S-фазу и необходим для поддержания их активной пролиферации, тогда вероятно, что эти процессы можно стимулировать при помощи экзогенного этилена. После предобработки 10-дневных клеток этиленом в концентрации 100 мкл/л в течение 5 ч их инокулировали в свежую среду и культивировали в атмосфере с той же концентрацией этилена. В результате через



**Рис. 5.** Влияние экзогенного этилена на количество S-фазных клеток в зависимости от момента обработки этиленом гетеротрофной суспензионной культуры *A. thaliana* в течение цикла выращивания.

1 – предобработка клеток за 5 ч до инокуляции, анализ через 3 ч после инокуляции; 2 – культивирование в газовой среде с этиленом в течение 24 ч после инокуляции; 3 – культивирование в газовой среде с этиленом в течение 96 ч после инокуляции; 4 – начало культивирования в газовой среде с этиленом через 24 ч после инокуляции, анализ через 72 ч; 5 – начало культивирования в газовой среде с этиленом через 96 ч после инокуляции, анализ через 120 ч; 6 – начало культивирования в газовой среде с этиленом через 120 ч после инокуляции, анализ через 216 ч. Стрелка вверх – время начала инкубации в газовой среде с этиленом. Стрелка вниз – время фиксации для анализа количества S-фазных клеток. Черная колонка – контрольный вариант; серая колонка – процент к контролю.

три часа количество S-фазных клеток было в два раза больше по сравнению с клетками, которые культивировали в воздухе (рис. 4, колонка 3; рис. 5, вариант 1). Если начинали культивирование суспензии клеток в газовой среде с 20 мкл/л или 100 мкл/л этилена сразу после инокуляции, то ни на 1-е, ни на 4-е сутки эффекта не наблюдали (рис. 5, варианты 2, 3). Аналогичный результат получили при действии 100 мкл/л этилена с первых по третьи сутки (рис. 5, вариант 4). Небольшое увеличение количества S-фазных клеток наблюдали при их культивировании в атмосфере со 100 мкл/л этилена в течение 24 ч, начиная с четвертых суток (рис. 5, вариант 5). Если культуру клеток подвергали действию этилена, начиная с пятых суток (рис. 5, вариант 6), то на девятые сутки индекс S-фазных клеток значительно увеличился.

Следует отметить, что культивирование суспензии клеток в газовой среде с этиленом сразу после инокуляции реально означает – через 1 ч после инокуляции, поскольку необходимо время для закрытия культуральных сосудов, герметизации газовых колоколов и введения этилена. Возможно, что этилен, продукция которого индуцируется во время инокуляции клеток в свежую питательную среду, занимает все “посадочные”

места на рецепторах, и “отвечать” на экзогенный этилен в данный момент некому. Тем не менее, если сравнить кривую 1 на рис. 2 и рис. 5, то становится очевидным, что экзогенный этилен эффективен тогда, когда продукция эндогенного этилена мала. Этилен в концентрациях, которые мы использовали в своей работе, не снижал жизнеспособность культуры клеток. Более того, культивирование клеток с этиленом в течение всего цикла выращивания приводило к повышению индекса роста [24].

Таким образом, представленные в работе результаты дают основание рассматривать этилен не как “попутчика” пролиферации культивируемых клеток растений, а как активного участника ее регуляции, механизм действия которого еще предстоит разгадать.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках МЦП ЕврАзЭС “Инновационные биотехнологии” (Государственный контракт № 14.M04.12.0002).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Neljubow D.* Über die horizontale Nutation der Stengel von *Pisum sativum* und einiger anderer Pflanzen // *Beih. Bot. Zentralbl.* 1901. V. 10. P. 128–138.

2. Abeles F.B., Morgan P.W., Salveit M.E. Ethylene in Plant Biology. San Diego: Academic, 1992. 414 p.
3. McManus M.T. The Plant Hormone Ethylene. V. 44. Annual Plant Reviews. Oxford: Wiley-Blackwell, 2012. 416 p.
4. Bleecker A.B., Estelle M.A., Somerville C., Kende H. Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana* // Science. 1988. V. 241. P. 1086–1089.
5. Guzman P., Ecker J.R. Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants // Plant Cell. 1990. V. 2. P. 513–523.
6. Grierson D. 100 years of ethylene – a personal view // The Plant Hormone Ethylene. V. 44. Annual Plant Reviews. Wiley Online Library, 2012. P. 1–17. doi 10.1002/9781118223086.ch1
7. Ju C., Chang C. Advances in ethylene signaling: protein complexes at the endoplasmic reticulum membrane // AoB Plants. 2012: pls031. doi 10.1093/aobpla/pls031
8. Novikova G.V., Moshkov I.E., Smith A.R., Hall M.A. The effect of ethylene on MAPKinase-like activity in *Arabidopsis thaliana* // FEBS Lett. 2000. V. 474. P. 29–32.
9. Zhang J., Yu J., Wen C.K. An alternate route of ethylene receptor signaling // Front. Plant Sci. 2014. V. 5. doi 10.3389/fpls.2014.00648
10. Cho Y.H., Yoo S.D. Novel connections and gaps in ethylene signaling from the ER membrane to the nucleus // Front. Plant Sci. 2015. V. 5. doi 10.3389/fpls.2014.00733
11. Shakeel S.N., Gao Z., Amir M., Chen Y.F., Rai M.I., Haq N.U., Schaller G.E. Ethylene regulates levels of ethylene receptor/CTR1 signaling complexes in *Arabidopsis thaliana* // J. Biol. Chem. 2015. V. 290. P. 12415–12424.
12. Pierik R., Tholen D., Poorter H., Visser E.J.W., Voeseek L.A.C.J. The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation // Trends Plant Sci. 2006. V. 11. P. 176–183.
13. Polko J.K., Voeseek L.A.C.J., Peeters A.J.M., Pierik R. Petiole hyponasty: an ethylene-driven, adaptive response to changes in the environment // AoB Plants. 2011: plr031. doi 10.1093/aobpla/plr031
14. Apelbaum A., Burg S.P. Effect of ethylene on cell-division and deoxyribonucleic acid synthesis in *Pisum sativum* // Plant Physiol. 1972. V. 50. P. 117–124.
15. Herbert R.J., Vilhar B., Evett C., Orchard C.B., Rogers H.J., Davies M.S., Francis D. Ethylene induces cell death at particular phases of the cell cycle in the tobacco TBV-2 cell line // J. Exp. Bot. 2001. V. 52. P. 1615–1623.
16. Dan H., Imaseki H., Wasteneys G.O., Kazama H. Ethylene stimulates endoreduplication but inhibits cytokinesis in cucumber hypocotyl epidermis // Plant Physiol. 2003. V. 133. P. 1726–1731.
17. Ortega-Martínez O., Pernas M., Carol R.J., Dolan L. Ethylene modulates stem cell division in the *Arabidopsis thaliana* root // Science. 2007. V. 317. P. 507–510.
18. Love J., Björklund S., Vahala J., Hertzberg M., Kangasjärvi J., Sundberg B. Ethylene is an endogenous stimulator of cell division in the cambial meristem of *Populus* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 5984–5989.
19. Быстрова Е.И., Жуковская Н.В., Ракитин В.Ю., Иванов В.Б. Роль этилена в активации деления клеток покоящегося центра в отрезанных корнях кукурузы // Онтогенез. 2015. Т. 46. С. 82–86.
20. Nagata T., Nemoto Y., Hasezawa S. Tobacco BY-2 cell line as the 'HeLa' cell in the cell biology of higher plants // Int. Rev. Cytol. 1992. V. 132. P. 1–30.
21. Biddington N.L. The influence of ethylene in plant tissue culture // Plant Growth Regul. 1992. V. 11. P. 173–187.
22. Moshkov I.E., Novikova G.V., Hall M.A., George E.F. Plant growth regulators. III. Gibberellins, ethylene, abscisic acid, their analogues and inhibitors; miscellaneous compounds // Plant Propagation by Tissue Culture. V. 1. The Background / Eds. George E.F., Hall M.A., De Klerk G.-J. Dordrecht: Springer, 2008. P. 227–281.
23. LaRue T.A.G., Gamborg O.L. Ethylene production by plant cell cultures. Variations in production during growing cycle and in different plant species // Plant Physiol. 1971. V. 48. P. 394–398.
24. Фоменков А.А., Носов А.В., Ракитин В.Ю., Мамаева А.С., Новикова Г.В. Цитофизиологические особенности культивируемых клеток *Arabidopsis thaliana* с нарушенным восприятием сигнала этилена рецептором ETR1 // Физиология растений. 2014. Т. 61. С. 640–650.
25. Носов А.В., Фоменков А.А., Мамаева А.С., Соловченко А.Е., Новикова Г.В. Дополнительные возможности использования клик-реакции 5-этинил-2'-дезоксисуридина с азидами флюорохромов в изучении клеточного цикла и метаболизма дезоксирибонуклеозидов // Физиология растений. 2014. Т. 61. С. 893–904.
26. Ракитин В.Ю., Ракитин Л.Ю. Определение газообмена и содержания этилена, двуокиси углерода и кислорода в тканях растений // Физиология растений. 1986. Т. 33. С. 403–413.
27. Gould A.R., Everett N.P., Wang T.L., Street H.E. Studies on the control of the cell cycle in cultured plant cells // Protoplasma. 1981. V. 106. P. 1–13.
28. Meir S., Philosoph-Hadas S., Epstein E., Aharoni N. Carbohydrates stimulate ethylene production in tobacco leaf discs. I. Interaction with auxin and the relation to auxin metabolism // Plant Physiol. 1985. V. 78. P. 131–138.
29. Konze J.R., Kwiatkowski G.M.K. Rapidly induced ethylene formation after wounding is controlled by the regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthesis // Planta. 1981. V. 151. P. 327–330.
30. Mehrnia M., Balazadeh S., Zhanor M.I., Mueller-Roeber B. EBE, an AP2/ERF transcription factor highly expressed in proliferating cells, affects shoot architecture in *Arabidopsis* // Plant Physiol. 2013. V. 162. P. 842–857.