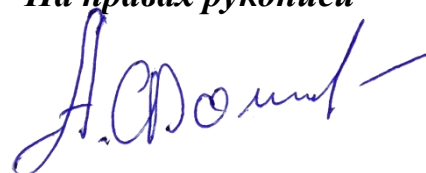


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева
Российской академии наук

На правах рукописи



Фоменков

Артём Алексеевич

**Влияние этилена на пролиферацию
культивируемых клеток *Arabidopsis thaliana***

1.5.21 — физиология и биохимия растений

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель —

доктор биологических наук

Носов Александр Владимирович

Москва — 2021

Оглавление

Список использованных сокращений.....	5
Введение	6
Глава 1. Обзор литературы	13
1.1. Рост растений и деление клеток	13
1.2. Пролиферация клеток и её регуляция	14
1.2.1. Основные молекулярные события, контролирующие клеточный цикл	18
1.2.2. Влияние внешних факторов на клеточный цикл растений	27
1.2.3. Фитогормоны — регуляторы клеточного цикла растений.....	30
1.2.3.1. Ауксины и цитокинины — важнейшие регуляторы пролиферации	32
1.2.3.2. Абсцизовая кислота, гиббереллины и brassinosteroids — ингибиторы и стимуляторы клеточного цикла	36
1.2.3.3. Этилен в процессах роста и пролиферации клеток растений .	37
1.3. Этилен — открытие гормональных функций, биосинтез и сигнальный путь	39
1.3.1. Биосинтез этилена.....	41
1.3.2. Сигнальный путь этилена	43
1.3.3. Мутанты растений <i>Arabidopsis thaliana</i> , связанные с сигнальным путём этилена	52
1.4. Культивируемые клетки растений — объект для цитофизиологических исследований	55
1.4.1. Исследование пролиферации и клеточного цикла в культурах клеток растений	56

1.4.2. Этилен в культуре клеток	57
Глава 2. Объекты и методы исследования	59
2.1. Объекты.....	59
2.2. Исследование ростовых характеристик.....	60
2.3. Цитофотометрическое определение количества ядерной ДНК	61
2.4. Выявление клеток, находящихся в S-фазе митотического цикла	62
2.5. Проточная цитометрия	64
2.6. Получение этилена, определение содержания этилена, двуокиси углерода и кислорода.....	65
2.7. Оценка скорости образования этилена	66
2.8. Культивирование клеток с экзогенным этиленом и 1-МСП	66
2.9. Культивирование клеток в условиях гипоксии.....	68
2.10. Исследование влияния 2,4-Д на синтез этилена отделёнными листьями <i>Arabidopsis thaliana</i>	69
2.11. Выделение белков из культивируемых клеток и растений.....	69
2.12. Электрофорез белков в денатурирующих условиях.....	70
2.13. Определение активности ферментов глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы	70
2.14. Вестерн блоттинг GAPC2.....	71
2.15. Определение экспрессии <i>ERF1</i> , <i>CYCA2;3</i> , <i>CYCB1;1</i> и <i>GAPC2</i>	72
2.16. Обработка данных и представление результатов	73
Глава 3. Результаты и обсуждение	74
3.1. Интенсивность роста суспензионных культур клеток и продукция этилена.....	74
3.1.1. Этилен в газовой фазе колб с культивируемыми клетками	74

3.1.2. Корреляция между удельной скоростью роста культур клеток и производством этилена	75
3.2 Влияние этилена на рост, цитофизиологию и пролиферацию суспензионных культур клеток <i>Arabidopsis thaliana</i>	77
3.2.1. Характеристика суспензионных культур клеток.....	77
3.2.2. Цитофотометрический анализ.....	79
3.2.3. Соотношение пролиферативной активности и продукции этилена в суспензионной культуре клеток Col-0.....	81
3.2.4 Выбор концентраций экзогенного этилена и 1-МСП — ингибитора его связывания с рецепторами.....	84
3.2.5. Влияние экзогенного этилена и 1-МСП на суспензионную культуру клеток Col-0.....	86
3.2.6. Влияние экзогенного этилена и 1-МСП на суспензионные культуры клеток <i>etr1-1</i> и <i>ctr1-1</i>	90
3.2.7. Влияние экзогенного этилена и 1-МСП на суспензионную культуру клеток <i>ein2-1</i>	94
3.2.8. Проявление повышенной чувствительности к недостатку кислорода культивируемых клеток <i>ein2-1</i> , биохимическая адаптация на уровне гликолиза	99
Заключение.....	106
Выводы	108
Список литературы.....	109

Список использованных сокращений

CTR — Constitutive Triple Response

DAPI — 4',6-диамидино-2-фенилиндол

EdU — 5-этинил-2'-дезоксинуридин

EIN — Ethylene Insensitive

ERS — Ethylene Response Sensor

ETR — Ethylene Response

МАРК — митоген-активируемая протеинкиназа

МАРКК — киназа МАРК

МАРККК — киназа МАРКК

PBS — фосфатносолевой буфер (от phosphate buffered saline)

SH — среда Schenk и Hildebrandt

АФА — активные формы азота

АФК — активные формы кислорода

АЦК — 1-аминоциклопропан-1-карбоновая кислота

АЦС — АЦК-синтаза

ДДС-Na-ПААГ — полиакриламидный гель, содержащий додецилсульфат натрия

КЦ — клеточный цикл

ОЕ — относительные единицы

ОТ — обратная транскрипция

ЭПР — эндоплазматический ретикулум

Введение

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Деление клеток — основа существования любого многоклеточного организма, включая высшие растения. Нарушения клеточной пролиферации у растений может иметь серьезные последствия, хотя растения достаточно устойчивы к изменениям уровня регуляторов клеточного цикла. Особое значение имеет понимание механизмов контроля пролиферации в искусственно созданных и создаваемых популяциях соматических клеток растений, лишённых управляющих связей целого организма и поддерживаемых на питательных средах *in vitro*. Уникальность таких биологических систем состоит в том, что активная пролиферация клеток является единственной причиной и гарантом их существования (Носов, 1999). Кроме того, культуры клеток растений занимают всё большее место в современной биотехнологии, как перспективные объекты для получения биологически активных веществ (Попова *с соавт.*, 2021). В этом аспекте — управление пролиферацией клеток *in vitro* очень важное и актуальное направление, поскольку необходимо решать задачи создания штаммов-продуцентов с достаточно высокими для рентабельного производства ростовыми и биосинтетическими характеристиками (Nosov, 2012).

С другой стороны, культивируемые *in vitro* клетки растений — прекрасный объект для исследования инвариантных биологических процессов, таких как деление клеток и его механизмы. Фитогормоны как внутриклеточные плеiotропные факторы, определяют направленность многих процессов в клетках растений, в том числе контролируют пролиферацию (Новикова *с соавт.*, 2013). Роль таких классических фитогормонов как ауксины, цитокинины, абсцизовая кислота и гиббереллины в пролиферации клеток растений изучена достаточно подробно. Наиболее спорный вопрос — влияние на пролиферацию клеток растений пятого классического фитогормона — этилена (Dubois *et al.*, 2018). Кроме того, механизмы восприятия и передачи сигнала этилена, хотя и изучаются не одно десятилетие, до сих пор открытый плацдарм (Binder, 2020). И самое важное —

культивируемые клетки растений продуцируют этилен в больших количествах и он накапливается в культуральных сосудах (Moshkov *et al.*, 2008). Таким образом, исследования механизмов управляющих пролиферацией культивируемых *in vitro* клеток растений, в том числе изучение эффектов этилена, влияние которого на клеточный цикл неоднозначно — актуальны и представляют особый интерес для фундаментальной науки и фитобиотехнологий опирающихся на использование активно растущих культур клеток для получения биологически активных веществ.

Исследования по влиянию этилена на пролиферацию культивируемых клеток растений, в основном датируются 70–80-ми годами прошлого столетия. В настоящее время появился современный арсенал аналитических приборов, появились новые представления о сигнальном пути этилена, но осталась старая проблема — какова роль этилена в пролиферации культивируемых клеток растений, разработанность которой очень далека от завершения.

Цель и задачи

Цель работы — исследовать влияние функциональной активности компонентов пути передачи этиленового сигнала на пролиферацию культивируемых клеток *Arabidopsis thaliana*.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать цитофизиологические характеристики культивируемых клеток *Arabidopsis thaliana* дикого типа и мутантов по генам, кодирующим компоненты этиленового сигнального пути.
2. Изучить динамику изменения количества клеток, синтезирующих ДНК, и выделения этилена в процессе субкультивирования клеточных штаммов *Arabidopsis thaliana*.
3. Исследовать эффекты этилена, ингибитора его рецепции 1-метилциклопропена (1-МСП), а также их совместного действия на цитофизиологические характеристики и пролиферацию культивируемых клеток *Arabidopsis thaliana* дикого типа и мутантов.

4. Исследовать влияние функционирования передачи этиленового сигнала на пролиферацию и жизнеспособность клеток в условиях гипоксии, как особенности условий *in vitro*.

Научная новизна

Впервые были получены суспензионные культуры клеток *Arabidopsis thaliana* из эксплантов растений с мутациями по гену рецептора этилена (аллель *etr1-1*) и по компонентам его сигнального пути (аллели *ctr1-1* и *ein2-1*). Впервые показано, что в отсутствие работающего рецептора этилена ETR1, этилен оказывает стимулирующее влияние на пролиферацию и жизнеспособность клеток. Впервые на культивируемых клетках растений нашло подтверждение участие в контроле пролиферации альтернативного пути (в обход EIN2) и канонического пути в ответе клеток на гипоксию.

Научная и практическая значимость исследования

Результаты диссертационной работы помогают расширить имеющиеся знания о работе этиленового сигнального пути, о механизмах рецепции и трансдукции этого фитогормона в клетках растений. Полученные результаты, касающиеся влиянию этилена на пролиферацию и цитофизиологические параметры суспензионных культур клеток, могут быть использованы для разработки новых и оптимизации уже имеющихся подходов в биотехнологических производствах, основанных на выращивании культур изолированных клеток высших растений.

Личный вклад автора

Личный вклад автора заключается в анализе литературных данных, участии в планировании и проведении экспериментов, последующей обработке и анализе полученных данных, подготовке материалов к публикации.

Методология и методы исследования

Методология исследования включала общепринятые протоколы и методики из специализированных источников информации. Работа выполнена с применением современных биохимических, цитофизиологических и физико-химических методов.

Положения, выносимые на защиту

На защиту выносятся результаты исследования влияния этилена на пролиферацию культивируемых клеток *Arabidopsis thaliana*. В частности:

1. Выявлена взаимосвязь между активной пролиферацией клеток *in vitro* и функционированием этиленового сигнального пути.
2. Выдвинуто предположение о функционировании альтернативного пути проведения сигнала этилена, отвечающего за пролиферацию в клетках мутанта *ein2-1*.
3. Обосновывается функциональная диверсификация рецепторов этилена в процессах контроля пролиферации.
4. Определена необходимость нормального функционирования пути восприятия и передачи сигнала этилена для своевременного устранения эффектов гипоксии в клетках *in vitro*.

Степень достоверности результатов, апробация работы и публикации

При выполнении работы были использованы современные и адекватные биохимические, цитофизиологические и физико-химические методы, что обеспечивает достоверность полученных результатов. Эксперименты проведены в достаточной биологической и аналитической повторности. Выводы обоснованы экспериментальными данными и отражены в печатных работах.

Результаты исследования были представлены в стендовых и устных докладах на следующих международных конференциях:

1. Международная научно-практическая конференция «Клеточная биология и биотехнология растений», 13 – 15 февраля 2013 г., Минск, Беларусь.
2. XX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных Ломоносов-2013. 8 – 13 апреля 2013 г., Москва.
3. Международный симпозиум «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений», 17 – 20 сентября 2013 г., Казань.
4. XXII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных Ломоносов-2015. 13 – 17 апреля 2015 г., Москва.
5. Всероссийская научная конференция с международным участием и школа для молодых ученых. 21 – 26 сентября 2015 г., Петрозаводск.
6. Всероссийская научная конференция с международным участием и школа для молодых учёных «Фундаментальные и прикладные проблемы современной экспериментальной биологии растений» посвящённая 125-летию Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН. 23 – 27 ноября 2015 г., Москва.
7. Современные проблемы экспериментальной ботаники: I Международная научная конференция молодых учёных, приуроченная Году науки в Республике Беларусь. 27 – 29 сентября 2017 г., Минск.
8. XI Международная конференция «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология». 23–27 сентября 2018 г., Минск.
9. Europe Biobank Week 2019. 8–11 October 2019, Lübeck, Germany.
10. Всероссийская научная конференция с международным участием «Экспериментальная биология растений и биотехнология: история и взгляд в будущее». 27 сентября – 1 октября 2021 г.

По материалам диссертации опубликовано 27 работ, из которых 8 – в международных рецензируемых журналах.

Основные публикации по теме исследования:

1. **Степанченко Н.С., Фоменков А.А., Мошков И.Е., Ракитин В.Ю., Новикова Г.В., Носов А.В.** (2012) Взаимодействие фитогормонов в контроле пролиферации культивируемых *in vitro* клеток этилен-нечувствительных мутантов *Arabidopsis thaliana*. Доклады академии наук. **442**: 714–717.
2. **Новикова Г.В., Носов А.В., Степанченко Н.С., Фоменков А.А., Мамаева А.С., Мошков И.Е.** (2013) Пролиферация клеток растений и ее регуляторы. Физиология Растений. **60(4)**: 529–536.
3. **Носов А.В., Фоменков А.А., Мамаева А.С., Соловченко А.Е., Новикова Г.В.** (2014) Дополнительные возможности использования клик-реакции 5-этинил-2'-дезоксинуридина с азидами флюорохромов в изучении клеточного цикла и метаболизма дезоксирибонуклеозидов. Физиология растений. **61(6)**: 893–904.
4. **Седов К.А., Фоменков А.А., Соловьева А.И., Носов А.В., Долгих Ю.И.** (2014) Уровень генетической изменчивости клеток в длительно культивируемой суспензии *Arabidopsis thaliana*. Известия Российской академии наук, Серия биологическая. **6**: 565–572.
5. **Фоменков А.А., Носов А.В., Ракитин В.Ю., Мамаева А.С., Новикова Г.В.** (2014) Цитофизиологические особенности культивируемых клеток *Arabidopsis thaliana* с нарушенным восприятием сигнала этилена рецептором ETR1. Физиология растений. **61(5)**: 640–650.
6. **Фоменков А.А., Носов А.В., Ракитин В.Ю., Суханова Е.С., Мамаева А.С., Соболюкова Г.И., Носов А.М., Новикова Г.В.** (2015) Этилен сопровождает пролиферацию культивируемых клеток растений или участвует в её регуляции? Физиология Растений. **62(6)**: 839–846.
7. **Novikova G.V., Mur L.A.J., Nosov A.V., Fomenkov A.A., Mironov K.S., Mamaeva A.S., Shilov E.S., Rakitin V.Y., Hall M.A.** (2017) Nitric Oxide Has a

Concentration-Dependent Effect on the Cell Cycle Acting via EIN2 in *Arabidopsis thaliana* Cultured Cells. *Front Physiol.* **8**: 1–11.

8. **Попова Е.В., Носов А.В., Титова М.В., Кочкин Д.В., Фоменков А.А., Куличенко И.Е., Носов А.М.** (2021) Перспективные биотехнологии: Коллекции культур клеток высших растений как основа разработки и производства лекарственных препаратов. *Физиология Растений.* **68(3)**: 227–244.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Рост растений и деление клеток

По-видимому, наиболее универсальное определение роста растений предложил Дмитрий Анатольевич Сабинин: (Сабинин, 1963) «рост — процесс новообразования элементов структуры организма». Элементы здесь, и органы, и клетки, и органеллы. Безусловно, формирование организма с определённой системой органов и тканей, состоящих из клеток, обладающих специфическими функциями, предполагает дифференциальную активность генов в этих клетках, то есть клеточную дифференцировку.

Тем не менее, деление клеток — основа существования любого многоклеточного организма, включая высшие растения. Здесь, уместно процитировать Ольгу Игоревну Епифанову (Епифанова, 1997): *«Пожалуй, с наибольшим лаконизмом охарактеризовал сущность процесса клеточного деления современник этого открытия Эдмунд Вильсон, сказавший, что “от клеточного деления зависят не только явления наследственности, но и сама непрерывность жизни”»*.

В жизненном цикле клетки можно выделить ещё два этапа — увеличение её размеров за счёт растяжения (рост клетки) и гибель клетки. Эти процессы в различной их комбинации во времени и пространстве составляют программу индивидуального развития организма в целом. Очевидно, что выполнение такой программы требует чёткой координации регулирующих её механизмов. Важным здесь является как контроль деления, так и переключение на процессы роста растяжением, цитодифференцировки и гибели. Такая координация, по-видимому, определяет оптимальный размер клеток, пригодный для деления или выхода из меристематического «домена» (Barlow, 1971; Francis, Halford, 1995). Идеальную ситуацию, вероятно, представляет последовательное чередование роста и репродукции клеток (Hunt, 1991).

Специфика развития растений состоит в том, что осевые органы растут в течение всей жизни. Такой постоянный и длительный рост обусловлен существованием апикальных меристем, клетки которых сохраняют способность к непрерывной пролиферации. Покидая меристематическую зону, клетки переходят к растяжению и дифференцировке, причём переход к растяжению (росту с относительно бóльшей скоростью) или остановка роста, — происходят одновременно для клеток всех тканей, расположенных на одном и том же расстоянии от меристемы. Этим объясняется пространственная непрерывность тела растения (Иванов, 1974; Иванов, 1997; Иванов, 2011).

Следовательно, в целом растении рост и пролиферация клеток должны быть согласованы, что постоянно наблюдается и является очевидным фактом. Однако выяснение механизмов координации пролиферации и роста клеток, по-прежнему остаётся одной из важнейших задач биологии клетки растений (Sablowski, Carnier Dornelas, 2014; Sablowski, 2016).

1.2. Пролиферация клеток и её регуляция

Под пролиферацией клеток (от латинского *proles* — потомство и *fero* — несу), принято понимать их новообразование путем размножения делением. Пролиферативный, или чаще обозначаемый как митотический цикл (МЦ) — комплекс взаимосвязанных и детерминированных хронологически событий, происходящих в клетке в период времени от начала подготовки к делению, на протяжении самого митоза и до завершения в двух дочерних клетках всех процессов, связанных с делением. Упрощая, можно дать такое определение МЦ: упорядоченная во времени последовательность событий, происходящих между двумя митозами (Епифанова *с соавт.*, 1983).

Данные литературы показывают, что основные процессы, определяющие пролиферацию и контролирующие последовательность событий МЦ, являются общими для клеток эукариот, включая линии, длительно поддерживаемые *in vitro* (Jacobs, 1992; Francis, Halford, 1995).

Со времени классической работы Альмы Ховард и Стивена Пелка (Howard, Pelc, 1953), которые с помощью метода радиоавтографии изучали включение ^{32}P в ДНК клеток корня конских бобов и показали, что период синтеза ДНК занимает часть интерфазы и отделён временными интервалами от начала и окончания митоза, МЦ делят на четыре периода (Рис. 1): собственно митоз (**M**), пресинтетический период (**G₁**), период синтеза (репликации) ДНК (**S**) и постсинтетический (или премитотический) период (**G₂**).

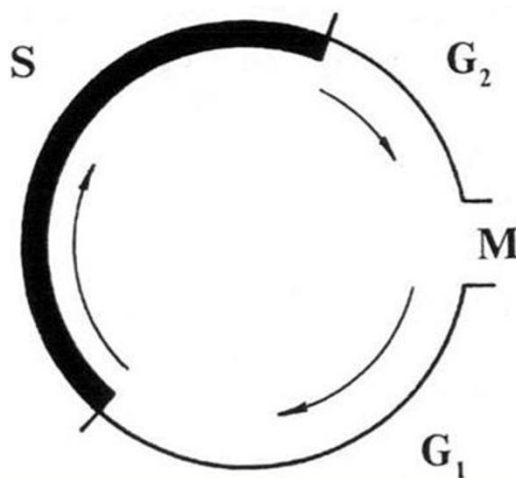


Рис. 1. Схема митотического цикла, принятая после открытия Ховард и Пелка (Howard, Pelc, 1953). **M** — митоз, **G₁** — пресинтетический период, **S** — период синтеза (репликации) ДНК, **G₂** — премитотический период.

В непрерывно размножающихся популяциях клеток (эмбриональные ткани, меристемы и т.п.) очередной МЦ начинается сразу же после окончания предыдущего, то есть его продолжительность совпадает со всем периодом существования клетки, равно как с её жизненным циклом.

Однако во взрослом многоклеточном организме часть клеток после завершения очередного раунда делений не начинает подготовку к следующему МЦ и переходит к дифференцировке и выполнению тканеспецифичных функций. Доля таких клеток может быть весьма значительной и период жизни клеток, в течение которого они выполняют специфические функции в отсутствие пролиферации, не относят к МЦ, а включают в жизненный (или клеточный) цикл (КЦ). Отношение

числа пролиферирующих (делящихся) клеток к общему числу клеток популяции получило название «фракции роста» или «пролиферативного пула» (Епифанова *с соавт.*, 1983). Понятия МЦ и КЦ часто отождествляют для тех популяций, где эти циклы совпадают. В настоящей работе мы будем использовать понятие КЦ, тем не менее, акцентируя в определённых случаях существование различий.

В эволюционном плане выделяют несколько типов организации КЦ (Епифанова *с соавт.*, 1983). Прокариотический тип, при котором концентрация индукторов синтеза ДНК определяется скоростью синтеза белка и поддерживается на высоком уровне, что приводит к постоянной репликации ДНК. Клетки с такой организацией КЦ не нуждаются в экзогенных стимуляторах размножения. Прimitивный эукариотический тип, наблюдаемый у низших свободноживущих эукариотов, включает период G_2 — состояние некомпетентности к индукторам репликации. Это обусловлено особенностями организации генома, требующего конденсации хроматина и специального периода — митоза, для сегрегации хромосом. Наличие или отсутствие периода G_1 зависит от интенсивности синтеза белка в предыдущем цикле и от скорости накопления индукторов синтеза ДНК. При этом клетки также не нуждаются в экзогенных стимуляторах размножения, поскольку подготовка к синтезу ДНК носит в них конститутивный характер. Высший эукариотический тип КЦ характерен для многоклеточных организмов. Клеткам с таким типом цикла присуща зависимость от экзогенных стимуляторов и индуцибельный синтез индукторов репликации ДНК.

Высшие растения обладают эукариотическим типом КЦ. Это означает, что работа генетически обусловленной программы модулируется внешними факторами и стимулами.

Физиологическая роль фазы G_1 заключается в осуществлении роста и связанных с ним процессов первичного метаболизма клеток. В данной стадии активно идут процессы транскрипции и трансляции, подготовка клеток к синтезу ДНК. Фаза G_1 самая вариабельная из всех фаз КЦ. Существует взаимосвязь между

интенсивностью делений клеток и продолжительностью G_1 -периода: как правило, он удлиняется с уменьшением пролиферативного потенциала клеток.

В S -периоде происходит удвоение ДНК ядра, равномерно распределяемой впоследствии между двумя дочерними клетками. Содержание ДНК в ядре принято выражать значением C . В 1950 году Hewson Swift ввёл обозначение “ C ”, имея в виду постоянное (“Constant”) содержание ДНК в клетках различных тканей организма (Swift, 1950a; Swift, 1950b). За величину $1C$ принимают количество ДНК в нереплицированном гаплоидном наборе хромосом (Bennett, Smith, 1976; Greilhuber *et al.*, 2005). В растениях количество ядерной ДНК варьирует в очень больших пределах. Наименьшее количество ДНК (0.1 пг), приходящееся на $1C$ обнаружено у *Genlisea margaretae* (Kejnovsky *et al.*, 2009), а наибольшее — 152.2 пг принадлежит *Paris japonica* (Pellicer *et al.*, 2010). Значения C определены для растений многих видов и доступны, например, в базе данных Kew Botanical Garden. Исходя из данных, имеющихся в литературе, можно сделать вывод, что продолжительность S -периода является результатом взаимодействия нескольких факторов, таких, как содержание ядерной ДНК и длина отдельных репликонов, количество и размер семейств репликонов, а также синхронность процессов, происходящих в отдельных семействах репликонов (Francis *et al.*, 1985; Van't Hof, 1996; Bechhoefer, Rhind, 2012; Duronio, 2012; Sacco *et al.*, 2012; Šimová, Herben, 2012).

Период G_2 , как правило, короче G_1 - и S -фазы, а вариации его длительности обычно меньше, чем у G_1 -периода. События фазы G_2 связаны с завершением S -периода, реорганизацией цитоскелета и подготовкой к митозу. В митозе происходит равное распределение удвоенного хромосомного материала между дочерними клетками благодаря функционированию веретена деления. Митоз — наиболее короткая (в среднем 1–3 ч) и наименее вариабельная стадия КЦ.

Весь процесс контроля и реализации деления клетки условно можно разделить на три уровня. Во-первых, наличие в достаточном количестве определённых управляющих сигналов и функционирование механизмов их

восприятия и проведения. Во-вторых, активность всех компонентов специфичной для клеточного деления регуляторной сети. В-третьих, субстратное, структурное и функциональное обеспечение конечных процессов КЦ — синтеза ДНК, синтеза гистонов, сборки митотического аппарата, конденсации хромосом и т.д.

1.2.1. Основные молекулярные события, контролирующие клеточный цикл

Многие процессы в жизни клеток контролируются обратимым фосфорилированием определённых белков-мишеней. У человека около 2% всех функционально активных генов кодируют протеинкиназы, а у *Arabidopsis thaliana* — около 4%, что, безусловно, подтверждает важную роль протеинкиназ для клеток животных и растений (Lehti-Shiu, Shiu, 2012). В своё время, наличие большого числа условно летальных мутантных штаммов по клеточному циклу — *cdc* (*cell division cycle*) мутантов, полученных у дрожжей, сформировало одно из направлений в изучении молекулярных механизмов контроля пролиферации. Это направление связано с изолированием генов, способных исправлять дефекты у *cdc* мутантов дрожжей. Центральное место среди таких генов заняли *cdc2* у *Schizosaccharomyces pombe* или *CDC28* у *Saccharomyces cerevisiae*, кодирующие 34-кД белок (p34^{cdc2}) — серин/треониновую протеинкиназу, активность которой, зависящая в свою очередь от фосфорилирования или дефосфорилирования собственных аминокислотных остатков необходима для прохождения клетками дрожжей границ между G₁- и S-, а также G₂- и M-периодами КЦ. Было показано, что ген человека, аналогичный *cdc2*⁺ *S. pombe*, также (наряду с *CDC28*⁺) способен комплементировать мутацию *cdc2*⁻ у *S. pombe* (Cross *et al.*, 1989). В дальнейшем было обнаружено несколько групп белков, выявляемых только в определённых периодах КЦ, названных циклинами. В ответ на пролиферативные стимулы, которыми могут быть факторы роста, в клетках млекопитающих появляются формы D-циклинов, которые взаимодействуют с протеинкиназами Cdk4 и/или Cdk6 (Cdk — циклин-зависимые киназы), что приводит к фосфорилированию белков-супрессоров, таких как pRb — супрессор опухолевого роста, впервые

обнаруженный в клетках ретинобластомы, и ему подобных белков (Hinds, Weinberg, 1994; Sherr, Roberts, 1999). Это приводит к активации факторов транскрипции E2F-типа, которые высвобождаются из комплекса с белками-супрессорами, и включается экспрессия генов, необходимых для перехода из **G₁**- в **S**-период КЦ (Satyanarayana, Kaldis, 2009). Далее, на границе **G₁/S** экспрессируется циклин E и связывается с Cdk2. Активность этого комплекса необходима для перехода указанной границы и запуска репликации ДНК. Прохождение **S**-периода требует взаимодействия Cdk2 с циклином A, в митозе работает циклин B. Функционирование комплексов Cdk–циклин регулируется двумя семействами ингибиторов Cdk как в нормальных условиях, так и (преимущественно) при стрессах, повреждениях ДНК, дисфункции теломер и др. Представители семейства INK4 специфично связываются с Cdk4 и Cdk6 и препятствуют работе циклинов D-типа, а белки семейства Cip/Kip ингибируют комплексы Cdk2–циклин E, Cdk2–циклин A, Cdk1–циклин A и Cdk1–циклин B (Satyanarayana, Kaldis, 2009).

А что же у растений? Ещё в 60-е годы прошлого столетия Jack Van't Hof продемонстрировал на отделённых кончиках корней *Pisum sativum*, что при отсутствии сахарозы в среде (Van't Hof, 1966) или при обработке пуромицином (Webster, Van't Hof, 1969) происходил арест КЦ в **G₁**- или **G₂**-периоде. Эти данные согласуются с парадигмой о главных контрольных точках КЦ при переходе **G₁/S** и **G₂/M** и говорят о необходимости синтеза белка для успешного продвижения в обеих контрольных точках (Van't Hof, 1973).

Более того, каскад протеинкиназных и протеинфосфатазных реакций, управляющих КЦ, является универсальным и для клеток растений. По современным представлениям (Menges *et al.*, 2005; Inzé, De Veylder, 2006; Genschik *et al.*, 2014; Polyn *et al.*, 2015; Scholes, Paige, 2015; Gutierrez, 2016) продвижение по КЦ обеспечивается скоординированным взаимодействием множества белков-регуляторов, среди которых ключевые позиции, так же как у млекопитающих, занимают циклины (CYC) и циклин-зависимые киназы (CDK), экспрессирующиеся в определённые временные периоды КЦ. Растения обладают наибольшим числом

белков-регуляторов КЦ и своими уникальными представителями, например, только у растений есть CDK В-типа (Harashima *et al.*, 2013; Blomme *et al.*, 2014). Существует около 10 типов циклинов и 8 типов CDK растений. Например, у *Arabidopsis* 13 белков относят к CDK и 49 белков относят к CYC, хотя не все они «замечены» в процессах регуляции КЦ (Dudits *et al.*, 2007; Nieuwland *et al.*, 2007; De Veylder *et al.*, 2007; Van Leene *et al.*, 2010; Blomme *et al.*, 2014; Jia *et al.*, 2014). Каждый тип включает подклассы, например у *Arabidopsis* — CYCA2;3 — третий представитель второго подкласса циклинов А-типа, правда пока не показано, что все виды растений имеют все типы CYC и CDK. Надо отметить, что идентификация и классификация CDK и CYC растений иногда основывается на присутствии в генах и соответствующих полипептидах специфичных последовательностей нуклеотидов и аминокислотных остатков без физиологической и биохимической верификации. Тем не менее, даже внутри одного подкласса CYC отличаются не только по «графику» их работы в КЦ, но и по типу и числу CDK, ингибиторов и структурных белков, с которыми они могут взаимодействовать, указывая на значительную функциональную диверсификацию механизмов контроля КЦ. Так, например, у *Arabidopsis*, по данным интерактома обнаружено 92 потенциальных варианта комплексов CDK–CYC (Van Leene *et al.*, 2010).

Тем не менее, существует три типа циклинов, для которых постулирована роль в регуляции КЦ: CYCA, CYCB и CYCD (Vandepoele *et al.*, 2002). Специфичные комплексы CDK–CYC регулируют переход в основных контрольных точках КЦ (**G₁/S** и **G₂/M**). Комплексы CDKA;1–CYCD обеспечивают переход из **G₁**- в **S**-период путём фосфорилирования белка RBR1 (RETINOBLASTOMA-RELATED 1, ретинобластома-подобный белок 1) и тем самым освобождают факторы транскрипции E2Fa и E2Fb, которые в комплексе с белками димеризации (DPa) обеспечивают «**G₁**-волну транскрипции» (Desvoyes *et al.*, 2014), активируя экспрессию **S**-фазных генов. Комплексы CDKA;1–CYCA3 контролируют прохождение **S**-фазы, CDKB1–CYCA2/B2/B3 обеспечивают прохождение

G_2 -периода и инициацию митоза, а CDKB2–CYCB1 и CDKA–CYCD3;1 ответственны за прохождение митоза (Рис. 2, Рис. 3).

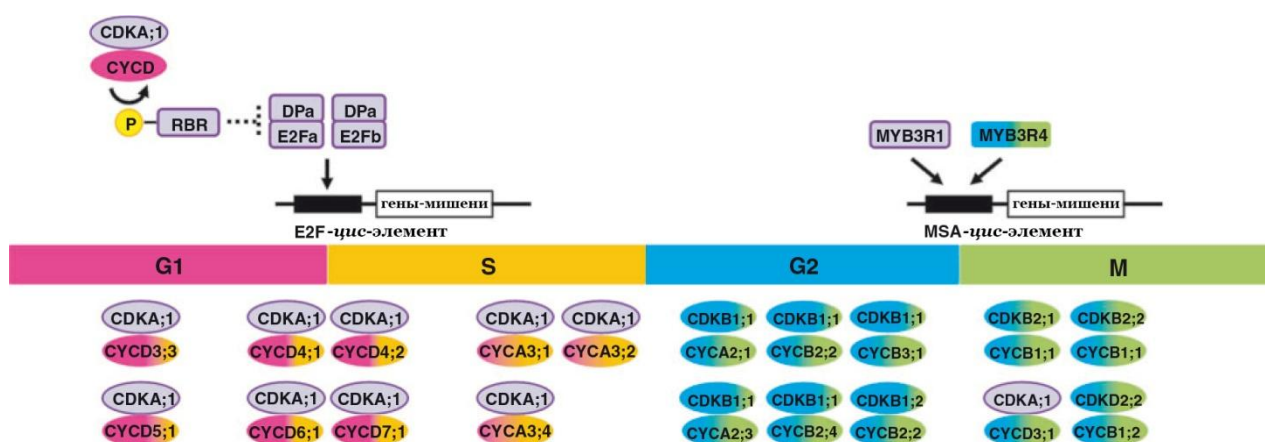


Рис. 2. Многие CYC и CDK экспрессируются в определенное время КЦ и их комбинаторное взаимодействие регулирует его продвижение в контрольных точках. Экспрессия генов *CDK* и *CYC* и функционирование, соответствующих им белков помечено цветом: для G_1 -, S -, G_2 - и M -периодов — розовым, жёлтым, синим и зелёным соответственно. Гены и их продукты, постоянно экспрессирующиеся в течение КЦ отмечены светло сиреневым цветом. По (Komaki, Sugimoto, 2012) с модификациями.

Данные, полученные на синхронизированной культуре клеток *Arabidopsis* с помощью ДНК-микрочипов (Menges *et al.*, 2005) хорошо подтверждают « G_2 -волну транскрипции» (Desvoyes *et al.*, 2014). Многие гены, экспрессия которых приурочена к G_2/M переходу КЦ (Рис. 2), содержат в промоторной области, так называемые MSA-мотивы (mitosis-specific activator), которые узнают факторы транскрипции типа MYBR3 (такие как MYB3R1 и MYB3R4 у *Arabidopsis*). К генам, экспрессия которых активируется подобным образом, относятся, например, *CYCB1* и *CYCB2*, а также ген *KNOLLE*, активность которого необходима для формирования клеточной пластинки после завершения митоза (Ito *et al.*, 1998; Ito, 2014). В свою очередь, митотические комплексы CDK–CYC фосфорилируют и активируют MYB3R (Araki *et al.*, 2004).

Функционирование CDK тонко регулируется: фосфорилирование Trp160 (или эквивалентного остатка треонина) CDK-активирующими киназами (CAK)

приводит к активации CDK (Umeda *et al.*, 2005), фосфорилирование N-концевого остатка тирозина протеинкиназой WEE1, которая обычно более активна при повреждениях ДНК (Cools *et al.*, 2011), — приводит к инактивации CDK (Рис. 3).

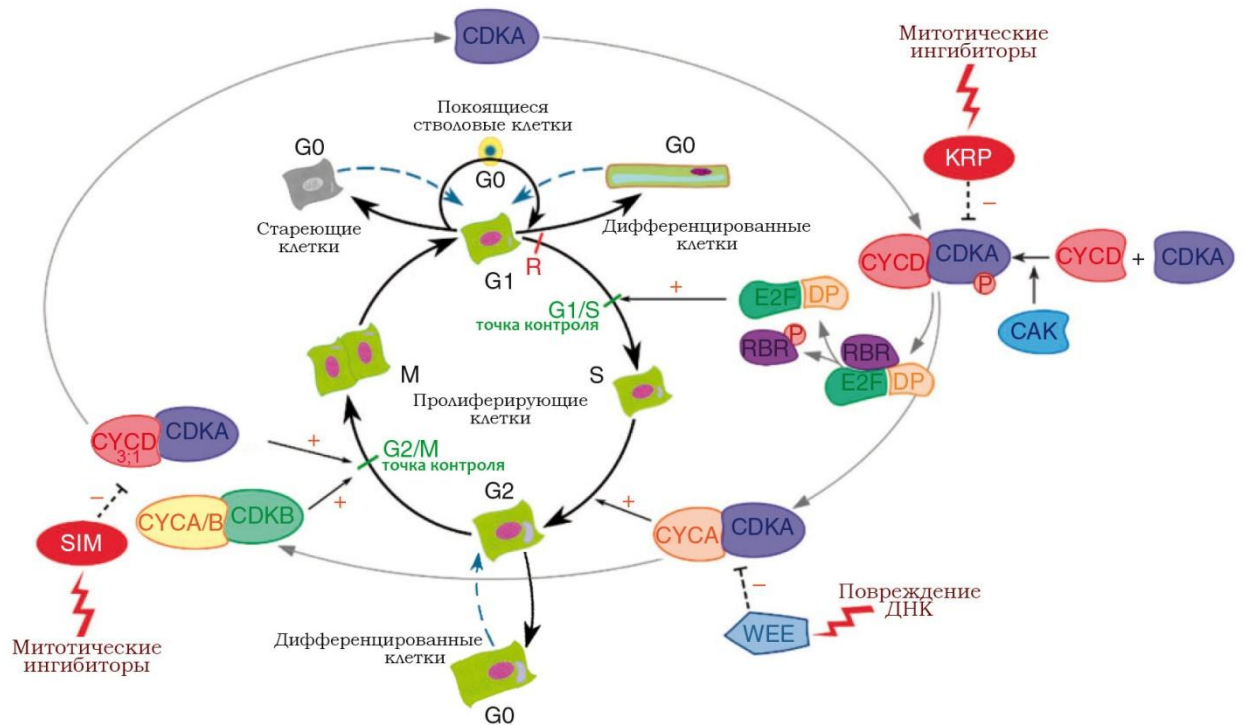


Рис. 3. Основные пункты функционирования активаторов и ингибиторов CDK и выхода клеток из МЦ. G_0 — состояние пролиферативного покоя клеток, присущее дифференцированным, стареющим и стволовым клеткам. В G_0 возможен выход из G_1 - и G_2 -периодов. При определённых условиях, например гормональных стимулах, клетки могут вернуться из G_0 в МЦ. CAK — CDK-активирующие протеинкиназы; WEE — CDK-инактивирующая протеинкиназа; KRP и SIM — ингибиторы CYC–CDK комплексов. По (Velappan *et al.*, 2017) с дополнениями по (Jakoby, Schnittger, 2004; Van Leene *et al.*, 2010; De Veylder *et al.*, 2011) и модификациями.

Кроме того, у кукурузы и томатов активность WEE1 сопряжена с эндоредупликацией (De Veylder *et al.*, 2011).

Дополнительно, активность CDK специфично ингибируют SKI (CDK Inhibitors, ингибиторы CDK). В растениях Kip-подобные белки (kip-related proteins, KRP или ингибиторы CDK, или ICK) содержат консервативный домен сходный с аналогичным доменом белков семейства Cip/Kip млекопитающих. У *Arabidopsis*

KRP-белки кодируют семь генов (De Veylder *et al.*, 2001) и ингибируют CDK в G_1/S (Рис. 3), что приводит к остановке МЦ и коммитирует клетки к эндоредупликации (Van Leene *et al.*, 2010; De Veylder *et al.*, 2011; Polyn *et al.*, 2015). Второе семейство ингибиторов CDK, известное как SIAMESE (SIM-белки), было обнаружено в связи с анализом мутантных растений *Arabidopsis* с нарушенным развитием трихом листьев (Churchman *et al.*, 2006). Многие представители белков SMR (SIM-related) могут взаимодействовать с CYCD и CDKA;1 (Churchman *et al.*, 2006; Van Leene *et al.*, 2010), но в основном, SIM-белки взаимодействуют с CDKB1;1 (Van Leene *et al.*, 2010; De Veylder *et al.*, 2011) (Рис. 3). Возможность регуляции SMR-белками CDKA–CYCD комплексов вероятно важна для адекватного контроля КЦ при действии биотических и абиотических стрессоров (Peres *et al.*, 2007).

Одно из самых ранних событий КЦ — лицензирование ДНК (точнее хроматина) — процесс активного доступа к хроматину и «заякоривания» на нём белков и белковых комплексов, включающих факторы репликации ДНК и модифицирующие хроматин белки (Desvoyes *et al.*, 2014). Репликация генома эукариотов требует активации тысяч точек начала репликации (replication origins), с которыми должны связаться комплексы инициации. Эти первичные регуляторные события — ассоциация пререпликативных комплексов (pre-RC) с каждой потенциальной точкой начала репликации, активируются в поздней телофазе практически сразу после распределения двух вновь сформированных ядер по дочерним клеткам. В раннем G_1 -периоде активность CDK должна быть низкой (Рис. 4), что необходимо для лицензирования точек начала репликации.

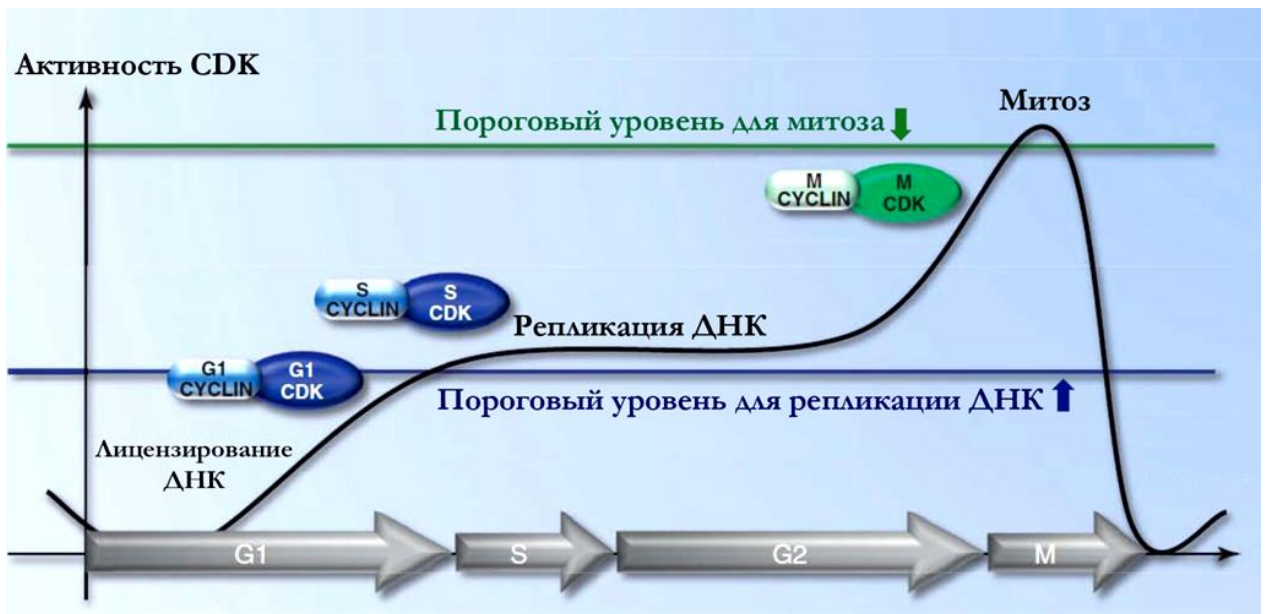


Рис. 4. Активность CDK в типичном КЦ. По (De Veylder *et al.*, 2011) с модификациями.

Позднее активность CDK возрастает (за счёт повышения уровня необходимых для этого CYC G_1 -периода, см. Рис. 2), достигая порога достаточного для инактивации RBR1 и старта (firing) работы репликонов, то есть запуска S-периода. Прохождение S-периода обеспечивают специфичные CDK–CYC комплексы, в G_2 -периоде активно транскрибируются циклины M-периода, активность митотических CDK возрастает и начинается митоз. Затем, для завершения митоза необходима деградация (протеолиз с участием 26S-протеасом) митотических циклинов CYCA1, CYCB1 и CYCB2 классов. Эти CYC содержат специфическую последовательность аминокислотных остатков (D-box, от destruction box), определяющую чувствительность к убиквитинированию и узнаваемую APC/C (Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome) E3-убиквитин лигазой, что ведет к присоединению убиквитина и быстрой протеолитической деградации митотических CYC (Genschik *et al.*, 2014; Ito, 2014). Вследствие этого активность CDK опять падает до уровня раннего G_1 -периода (Рис. 4 и Рис. 5).

Клетки могут покинуть МЦ и перейти в состояние G_0 (пролиферативный покой), характерное для дифференцированных, стареющих и стволовых клеток (Рис. 3), поскольку, как уже отмечалось, в целом растении рост и пролиферация

клеток должны быть согласованы. Следствие такой взаимозависимости — разные модификации КЦ, наиболее подходящие для конкретных стадий развития и физиологических потребностей определённых типов тканей или клеток (Jakoby, Schnittger, 2004). В одном крайнем случае, первые деления ядер эндосперма в формирующихся семенах цветковых растений, таких как *Arabidopsis*, не сопровождаются заметным ростом синцития (Boisnard-Lorig *et al.*, 2001). В другом случае, рост идёт за счёт растяжения клеток без их деления, как у клеток эпидермы гипокотилия в темноте, когда они увеличиваются в длину почти в 100 раз (Gendreau *et al.*, 1997). Одной из наиболее распространённых модификаций КЦ является эндоредупликация (синонимы: эндорепликация, эндоциклы, эндоплоидизация), при которой происходят множественные раунды репликации ДНК без последующей сегрегации хромосом и цитокинеза (De Veylder *et al.*, 2011; Maluszynska *et al.*, 2013; Breuer *et al.*, 2014; Scholes, Paige, 2015). Эндоредупликация обычно наблюдается в больших, метаболически активных или очень специализированных клетках, хотя встречается и в клетках, не совпадающих с этим описанием (Lee *et al.*, 2009).

Эндоредупликационные циклы представляют собой модифицированные МЦ в которых изменены стадии репликации ДНК и митоза. Важно, что при эндоциклах активность CDK не достигает уровня необходимого для запуска митоза (Рис. 5). Это происходит за счёт снижения уровня транскрипции предмитотических и митотических *CYC* А- и В-типов и *CDKB* при этом сохраняется активность CDKA;1 за счёт формирования комплексов с *CYC* D-типа и *CYCA3*, что обеспечивает прохождение S-периода (Nieuwland *et al.*, 2007; Maluszynska *et al.*, 2013).

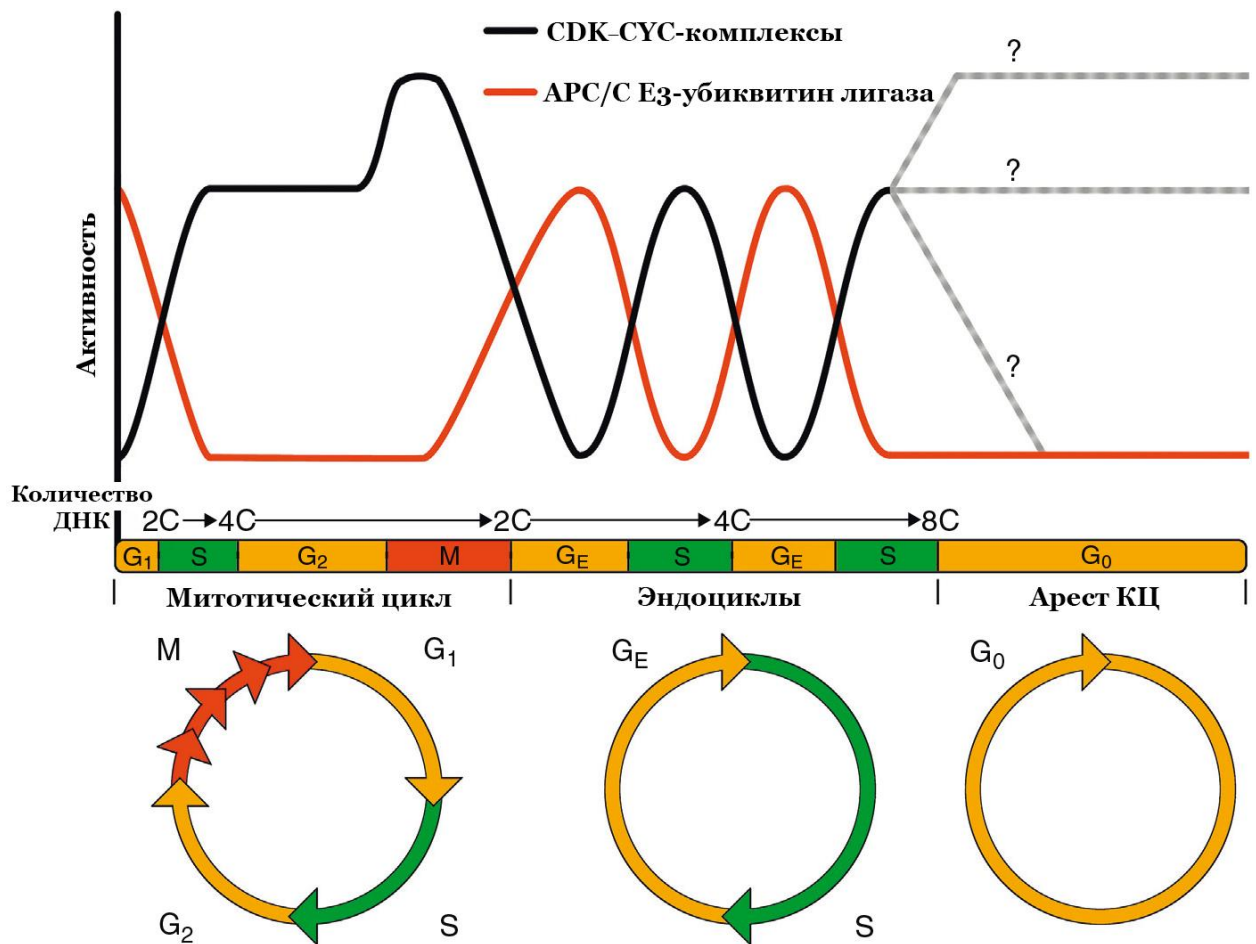


Рис. 5. Схема регуляции МЦ и эндоциклов. По (Breuer *et al.*, 2014) с модификациями.

Эндоциклы состоят из сменяющих друг друга специфичных для эндоциклов G_E- и S-периодов (Рис. 5), при этом наблюдается осцилляция в противофазе активностей CYC-CDK комплексов и убиквитин лигазы APC/C. По завершении эндоциклов активность APC/C падает, что позволяет клетке перейти в состояние пролиферативного покоя — G₀; наличие и активность CYC-CDK комплексов при этом остаётся не ясным аспектом (Breuer *et al.*, 2014).

Для растений миксоплоидия (эндополиплоидия), то есть присутствие в одной ткани клеток с разным содержанием ДНК — широко распространенное явление (Barow, Meister, 2003). Так, например, популяция клеток эпидермы листа растений *Arabidopsis* (Рис. 6) миксоплоидна (Melaragno *et al.*, 1993) и содержит ядра с количеством ДНК 2C (36%), 4C (48%), 8C (15%) и 16C (1%).

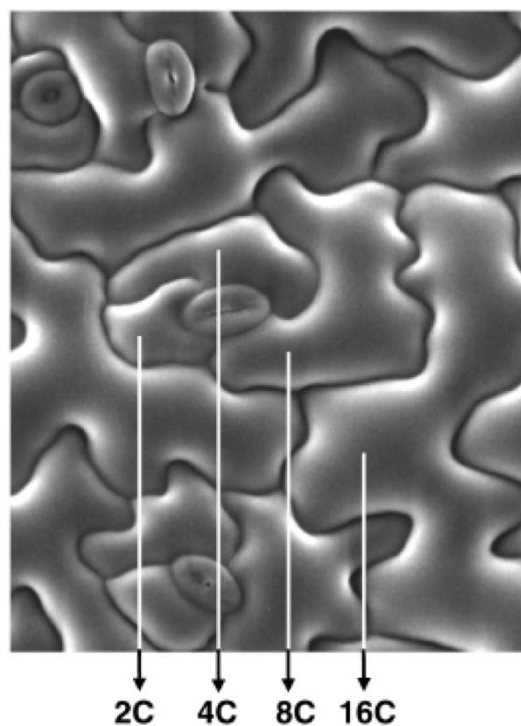


Рис. 6. Миксоплоидия эпидермы листа *Arabidopsis* (Gutierrez, 2009), микрофотография Bénédicte Desvoyes.

В настоящее время физиологическое значение эндополиплоидии еще не совсем понятно и в связи с этим интенсивно исследуется. Возможно, эндополиплоидизация представляет собой способ ускорения роста растений в конкретных экологических условиях, поскольку существует определенная зависимость между количеством ядерной ДНК и размером клеток (Melaragno *et al.*, 1993; Kondorosi *et al.*, 2000; Sugimoto-Shirasu, Roberts, 2003). Для культивируемых *in vitro* клеток миксоплоидия — также широко распространенное явление, которое может определяться как специфическими условиями культивирования (компоненты питательной среды, температура и др.), так и плоидностью исходного экспланта.

1.2.2. Влияние внешних факторов на клеточный цикл растений

Растения обладают различными механизмами, которые позволяют им адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды. Внешние факторы, такие как доступность воды, элементы питания, CO₂, свет и температура влияют на

рост и деление клеток, что отражается на размерах органов растения (Granier *et al.*, 2007).

При водном дефиците замедляется скорость деления клеток, уменьшаются размеры меристем, уменьшается число клеток листьев. Возрастает доля клеток, находящихся в G_1 -периоде, что указывает на увеличение его продолжительности и/или на остановку КЦ на границе G_1/S . При этом продолжительность S - G_2 - и M -периодов изменяется в меньшей степени (Granier *et al.*, 2007). Водный дефицит у многих видов растений приводит к остановке как МЦ, так и эндоциклов за счёт снижения активности CDK, хотя эндоредупликация может стимулироваться при слабом водном стрессе, как, например, в клетках мезофилла *Arabidopsis*, что позволяет растению поддерживать площадь листа при засухе через опосредованное плоидностью увеличение размеров клеток (Cookson *et al.*, 2006; Scholes, Paige, 2015). При недостатке азота или фосфора также наблюдается уменьшение размера меристем и скорости деления клеток (Granier *et al.*, 2007).

Повышение концентрации CO_2 ускоряет рост многих видов растений. При этом увеличение размеров листьев и корней связано с увеличением доли делящихся клеток в меристемах (Kinsman *et al.*, 1997; Taylor *et al.*, 2003). Очевидно, это связано с увеличением продуктивности фотосинтеза и, следовательно, концентрации углеводов.

Во многих случаях интенсивность света влияет на рост и деление клеток также опосредованно — через продуктивность фотосинтеза. Уменьшение интенсивности падающего света вызывает уменьшение финального числа клеток в листьях двудольных растений. При этом сходный эффект наблюдали когда интенсивность света уменьшали на 40% с помощью нейтральных светофильтров либо закрывали эквивалентную площадь фотосинтезирующей поверхности листа. Оба эти воздействия уменьшали относительную скорость деления клеток и не влияли на продолжительность пролиферативной активности листа. Уменьшение количества поглощённого света сопровождалось снижением фотосинтеза и содержания сахаров в тканях листа (Cookson, Granier, 2006; Granier *et al.*, 2007).

Свет, воспринимаемый растениями, варьирует по длительности светового периода в течение суток, по интенсивности и спектральному составу. По сравнению с другими переменными окружающей среды, продолжительность световой фазы является более предсказуемой и имеет фиксированный циклический характер в зависимости от географической широты. Длительность светового периода является важным фактором, контролирующим рост и развитие растений, обеспечивая через работу внутренних светозависимых циркадных часов регуляцию экспрессии многих генов (Oh *et al.*, 2012). Исследования влияния спектральных характеристик света на КЦ интенсивно проводятся на одноклеточных зелёных водорослях. Показано, что свет в синей области спектра (400–500 нм) ингибирует деление клеток *Protosiphon botryoides* через сигнал, передаваемый от пока ещё не идентифицированного фоторецептора (Nishihama, Kohchi, 2013), а красный свет стимулирует деление клеток *Chlamydomonas reinhardtii* (Beel *et al.*, 2012). У высших растений наблюдаются сходные эффекты. Например, увеличение доли синего света (с < 0.1% до 26%) ингибирует деление клеток, приводя к уменьшению длины междоузлий растений сои (Dougher, Bugbee, 2004). Свет, в целом, способствует пролиферации клеток, стимулируя активность фоторецепторов, что приводит к подавлению активности ингибиторов КЦ (Okello *et al.*, 2016). Свет влияет и на эндоредупликацию, подавляет эндоциклы. Например, в гипокотильях *Arabidopsis*, *Brassica oleracea* и *Pisum sativum*, в темноте проходит больше эндоциклов (Okello *et al.*, 2016). Однако при культивировании гетеротрофных тканей, например при индукции каллуса на эксплантах клубней топинамбура, свет оказывал негативное влияние на деление клеток (Yeoman, Davidson, 1971). Важным здесь является спектральный состав света. Например, непрерывный дальний красный свет устраняет негативное действие непрерывного синего света на синхронные деления в суспензионной культуре клеток табака, что связывают с фитохром-индуцированным биосинтезом ауксина (Qiao *et al.*, 2010).

Наиболее исследованный фактор внешней среды, влияющий на КЦ, это температура. Скорость деления клеток сильно зависит от температуры органов

растения. Множество данных показывает, что продолжительность всего КЦ уменьшается (следовательно, скорость деления клеток увеличивается) с повышением температуры (Granier *et al.*, 2007). Однако, не смотря на изменения в скорости деления клеток, окончательное число клеток в органе не изменяется в широких температурных пределах. Фактически, увеличение скорости деления клеток при повышении температуры компенсируется уменьшением продолжительности периода пролиферации клеток (Granier, Tardieu, 1998).

Показано, что замедление роста при низкой температуре — результат пропорционального увеличения продолжительности периодов КЦ, причём при минимальной постоянной температуре морфологические характеристики меристемы не изменяются. Предложено понятие критических температурных точек, на основе которых определяется оптимальная температура для КЦ (Гриф *с соавт.*, 2002).

1.2.3. Фитогормоны — регуляторы клеточного цикла растений

В качестве внутриклеточных плейотропных факторов, определяющих направленность многих процессов в клетках растений, рассматривают фитогормоны. При этом, чтобы показать эффект того или иного фитогормона часто используют их экзогенное введение. Начиная с исследований John Jablonski и Folke Skoog (Jablonski, Skoog, 1954) влияние гормональных сигналов на пролиферацию часто изучают на популяциях изолированных клеток растений, лишённых воздействия целого организма и позиционных факторов. Классической работой является обнаружение активации размножения клеток цитокининами (Skoog, Miller, 1957). Однако уже результаты ранних исследований показали, что для нормального деления клеток и протопластов в культуре *in vitro*, необходимо присутствие на отдельных этапах КЦ как ауксинов, так и цитокининов (Jouanneau, 1971; Бычкова, Бутенко, 1974; Meyer, Aspart, 1983). Так, для активации КЦ в культуре изолированных протопластов мезофилла табака ауксин необходим уже в первые часы культивирования, а цитокинин за 6–10 часов до S-периода (Carle *et al.*,

1998). Кроме того, давно обнаружено неоднозначное действие абсцизовой кислоты (АБК) на пролиферацию клеток. Наряду с проявлением ингибирующего эффекта (Barlow, Pilet, 1984; Nougarede *et al.*, 1987; Myers *et al.*, 1990) в некоторых системах АБК стимулировала рост, деление клеток и синтез ДНК (Nešković *et al.*, 1977; Minocha, 1979). Вероятно, влияние фитогормонов на рост и развитие растений, в том числе и на пролиферацию клеток, зависит от многих факторов: эндогенного их соотношения, светового режима, фазы развития популяции клеток или целого растения. Всё это может изменять направленность действия фитогормонов, как ещё четверть века назад было отмечено в работе Kenneth Thimann (Thimann, 1992).

В настоящее время убедительно показано, что фитогормоны могут влиять на одни и те же процессы, однако, парадоксально, но их сигнальные пути работают не избыточно. Современная парадигма определяет, что сигналы разных фитогормонов интегрируются на уровне геной сети, а их проведение сопряжено с перекрёстным разговором (cross-talk) сигнальных путей (Jaillais, Chory, 2010; Depuydt, Hardtke, 2011; Kohli *et al.*, 2013; Новикова *с соавт.*, 2013; Takatsuka, Umeda, 2014; Tank *et al.*, 2014) (Рис. 7). Рассмотрим регуляторное влияние на КЦ фитогормонов разных классов.

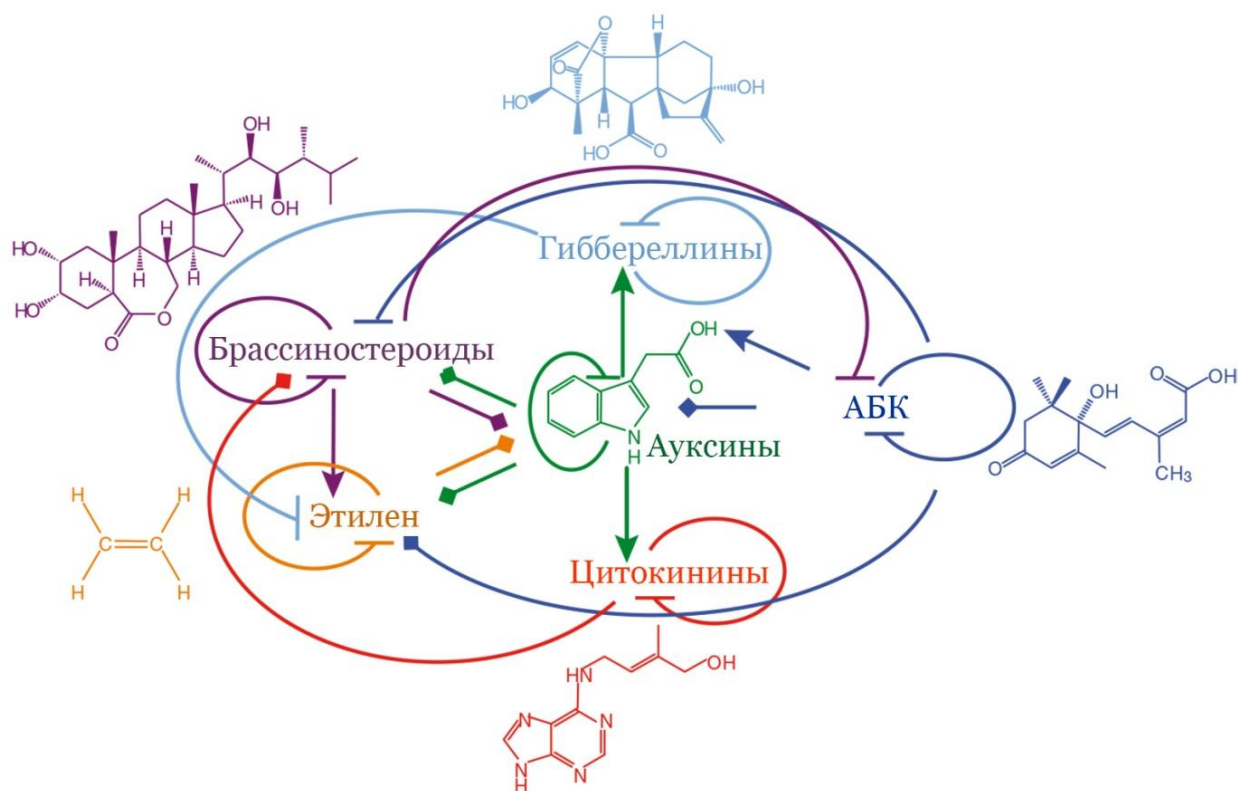


Рис. 7. Структура фитогормонов и некоторые их функциональные взаимодействия. Линии со стрелками — повышение транскрипционной активности генов отвечающих за синтез фитогормонов или снижение активности генов, связанных с инактивацией фитогормонов. Линии с чертой — снижение активности генов отвечающих за синтез фитогормонов или повышение активности генов, связанных с инактивацией фитогормонов. Линии, заканчивающиеся четырёхугольником — изменения в экспрессии генов с неоднозначным результатом. По (Jaillais, Chory, 2010) с модификациями.

1.2.3.1. Ауксины и цитокинины — важнейшие регуляторы пролиферации

Участие ауксинов и цитокининов в регуляции КЦ исследовано достаточно подробно. У *Arabidopsis* показана ключевая роль ауксина в формировании латеральных корней. Концентрация ауксина значительно повышается в инициальных клетках перикакла, что приводит к индукции делений этих клеток, формированию примordia и развитию активной меристемы, из которой в дальнейшем формируется латеральный корень (Péret *et al.*, 2009).

Исследование на суспензионной культуре клеток *Arabidopsis* эффектов ауксина (α -Нафтилуксусной кислоты, НУК), цитокинина (кинетина) и/или

сахарозы показало, что экспрессия генов, кодирующих компоненты регуляторной сети КЦ отвечает различным образом в зависимости от сочетания эффекторов (Richard *et al.*, 2002). Экспрессия генов *CDKA;1*, *CYCA2;1* и *CYCD* индуцировалась сахарозой, *CYCD3;1* кинетином и сахарозой, в то время как экспрессия генов *CDKB1;1* и *CYCB1;1* существенно повышалась при одновременном действии НУК и кинетина. Уровень транскриптов генов ингибиторов CDK, семейства *KRP* значительно снижался под влиянием фитогормонов и сахарозы (Richard *et al.*, 2002). Аналогичным образом, обработка проростков *Arabidopsis* ауксинами и цитокининами приводила к снижению транскрипции гена *KRP4* (Cho *et al.*, 2010).

На растениях *Arabidopsis* было показано, что ауксины (природный и синтетические) индуцируют транскрипцию гена *CDKA;1* в апексах корня, тогда как цитокинины — в зоне растяжения (Hemerly *et al.*, 1993). Экспрессия *CDKA;1* также значительно повышалась под влиянием ауксина и в корнях гороха (John, 2007). Достаточно высокий базальный уровень транскриптов и белка *CDKA;1* обнаруживается во всех живых клетках растений, даже не активно делящихся (Gorst *et al.*, 1991; Martinez *et al.*, 1992; Hemerly *et al.*, 1993), что, по-видимому, отражает уникальную способность клеток растений — возвращаться к делению. Другими словами, экспрессия *CDKA;1* отражает состояние компетентности к делению. Таким образом, ауксин определяет возможность деления клеток, стимулируя накопление достаточной концентрации *CDKA;1*, которая после взаимодействия с определёнными *CYCD* и *CYCA* обеспечит своей активностью прохождение контрольной точки **G₁/S** и собственно **S**-периода КЦ (см. Рис. 2 и Рис. 3).

Как уже отмечалось, культивируемые *in vitro* протопласты клеток растений — часто используемая система в исследованиях роли ауксинов и цитокининов в регуляции КЦ. На протопластах из клеток листа люцерны продемонстрировано, что процент делящихся клеток зависит от концентрации ауксина (Pasternak *et al.*, 2000). Без ауксина (2,4-Д) делений клеток не происходило, в присутствии 0.22 мкМ 2,4-Д отмечали единичные деления, а добавления 1 мкМ

2,4-Д было уже достаточно для инициации и поддержания делений клеток. Однако цитокинин (зеатин) был необходим для нормального прохождения S-периода и завершения митоза, что выражалось в повышении активности соответствующих CDK, а именно CDKA;1 и CDKB1;1. В отсутствие цитокинина белок CDKA;1 синтезировался, но не проявлял фосфорилирующей активности (Pasternak *et al.*, 2000). Совместное действие цитокинина и ауксина значительно усиливало и транскрипцию *CDKA;1* в культивируемых протопластах мезофилла табака (Nemerly *et al.*, 1993). Коллективный эффект ауксина и цитокинина наблюдали и в экспериментах с эксплантами из листьев люцерны. Обработка листовых эксплантов 2,4-Д несколько повышала общую активность CDK, определяемую по фосфорилированию гистона H1, а комбинация цитокинина и ауксина значительно увеличивала активность CDK (Mészáros *et al.*, 2000). Все представленные данные показывают, что цитокинин необходим для прохождения главных контрольных точек КЦ — G_1/S и G_2/M . Более того, вероятно сигнал цитокинина важен и для перехода между всеми фазами КЦ, поскольку в синхронизированной суспензии клеток табака (BY-2) наблюдается осцилляция внутриклеточной концентрации эндогенных цитокининов (в основном, в форме *транс*-зеатина) с максимумом перед границей G_1/S и пиками перед границами S/G_2 , G_2/M , и M/G_1 (Hartig, Beck, 2005).

Именно цитокинины включают важнейший механизм, который необходим для инициации КЦ — индуцируют транскрипцию *CYCD*, что обеспечивает формирование комплексов CDKA;1–*CYCD*, необходимых для перехода из G_1 - в S-период и активации экспрессии S-фазных генов (Soni *et al.*, 1995; Fuerst *et al.*, 1996; Riou-Khamlichi *et al.*, 1999; Menges *et al.*, 2006). Интересно, что у мутантных растений *Arabidopsis* с высоким содержанием эндогенных цитокининов отмечено трёхкратное увеличение уровня мРНК *CYCD3* по сравнению с растениями дикого типа, а из эксплантов трансгенных растений *Arabidopsis* с конститутивной экспрессией *CYCD3* можно получать каллусные ткани и поддерживать их пролиферацию без экзогенных цитокининов (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999).

Цитокинины и ауксины влияли на экспрессию генов *CYC*, *CDK* и ингибиторов *CDK* и в других экспериментальных системах. Транскрипция гена **G₂/M** циклина *CYCA2;1* повышалась в апексе побега *Arabidopsis* под действием цитокинина, в отличие от ауксина, который усиливал экспрессию *CYCA2;1* в корнях (Burssens *et al.*, 2000). Транскрипция гена митотического циклина *CYCB1;1* в растениях *Arabidopsis* активировалась ИУК (Ferreira *et al.*, 1994b), а в культуре клеток *Arabidopsis* отсутствие НУК приводило к резкому падению экспрессия **G₂/M** циклинов *CYCA2;1*, *CYCA2;2*, *CYCB2;1* и *CYCB2;2* (Ferreira *et al.*, 1994a). В культуре клеток люцерны 2,4-Д стимулировала экспрессию митоз-специфичной *CDKB2;1* в позднем **G₂**-периоде (Zhiponova *et al.*, 2006). Через сутки культивирования на среде, индуцирующей каллусообразование (среда с 2,4-Д), в эксплантах гипокотилей 5-недельных растений *Arabidopsis* повышалась экспрессия многих генов, связанных с КЦ, в том числе *CYCB1;1*, *CYCB2;2*, а уровень транскриптов *KRP1* и *SMR2* (ингибиторов *CDK*) — снижался (Chen *et al.*, 2012). Кроме того, ауксины и цитокинины участвуют и в других механизмах контроля КЦ.

Ауксины стабилизируют уровень белка фактора транскрипции E2FB, который регулирует прохождение **S**- и **M**-периодов, активируя экспрессию *CDKA;1* и *CDKB1;1*, при высоком уровне E2FB сокращается продолжительность КЦ (Magyar *et al.*, 2005). Недавно было показано, что F-box белок SKP2A (S-Phase Kinase-Associated Protein 2A) *Arabidopsis*, контролирующей стабильность E2FC/DPB — репрессоров транскрипции генов, регулирующих КЦ, способен напрямую связываться с ауксином, что приводит к убиквитинированию и протеолизу SKP2A вместе с его мишенями — E2FC/DPB, и это положительно сказывается на продвижении КЦ (Jurado *et al.*, 2010). То есть, можно говорить о возможности регуляции КЦ ауксином, в обход наиболее часто рассматриваемой и устоявшейся системы его рецепции — Aux/IAA-ARF-SCF^{TIR1/AFB} (Del Pozo, Manzano, 2014). В связи с этим, следует отметить, что ауксин-связывающий белок1, ABP1 (AUXIN BINDING PROTEIN1) — один из первых

охарактеризованных белков, для которого была показана способность с большой аффинностью связывать ауксин, и отвечающий всем критериям рецептора ауксина, открывает свои новые функции в регуляции КЦ (Sauer, Kleine-Vehn, 2011). На культуре клеток табака ВУ-2 показано, что функциональная инактивация АВР1 вызывает арест КЦ в G_1 -периоде и резкое падение экспрессии *CYCD3;1* — позитивного регулятора G_1/S перехода (David *et al.*, 2007; Tromas *et al.*, 2010).

Цитокинин может оказывать более прямое влияние на КЦ, которое не определяется его действием на передачу сигнала ауксина (Schaller *et al.*, 2014). Показано, что активированный цитокинином ARR2 (ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 2) напрямую связывается с промотором гена *CCS52A1* и индуцирует его экспрессию. Белок *CCS52A1* — активатор APC/C E3 убиквитин лигазы экспрессируется в переходной зоне и зоне растяжения корня и стимулирует деградацию митотических циклинов, что приводит к запуску эндоциклов (Takahashi *et al.*, 2013).

1.2.3.2. Абсцизовая кислота, гиббереллины и brassinosteroids — ингибиторы и стимуляторы клеточного цикла

Абсцизовая кислота (АБК) регулирует многие процессы роста и развития растений, включая созревание зародышей, покой семян, прорастание, деление клеток, растяжение, индукцию цветения и ответы на стрессоры, такие как засуха, засоление, холод, атака патогенов и УФ излучение (Finkelstein, 2013). Выше уже отмечалось, что АБК проявляет как ингибирующее, так и стимулирующее действие на КЦ. Как и для многих фитогормонов, это определяется концентрацией АБК и чувствительностью тканей и клеток растения (Humplík *et al.*, 2017).

АБК способствует увеличению размеров клеток эпидермы листа в процессе его формирования у растений *Arabidopsis*, не испытывающих водный стресс. Это связано со стимуляцией процессов эндоредупликации (Tanaka *et al.*, 2013). АБК активирует ингибиторы CDK (такие как KRP), что приводит к снижению активности CDK на границе G_1/S и коммитирует клетки к эндоредупликации

(Edgar *et al.*, 2014). С другой стороны, обработка АБК надземной части растений *Arabidopsis* ускоряет деление клеток корня, что подтверждается увеличением размера меристемы корня и интенсивностью экспрессии CYCB1;1::GFP (маркер митоза) и вызвано усилением базипетального транспорта ауксина (Xie *et al.*, 2020).

Хорошо известно, что гиббереллины способствуют росту за счет растяжения клеток, стимулируя разрушение репрессирующих рост белков DELLA. Однако DELLA также ингибируют пролиферацию клеток корня *Arabidopsis*, вызывая повышение уровня ингибиторов КЦ — KRP2 и SIM (Achard *et al.*, 2009). Гибберелловая кислота активирует КЦ при быстром интернодальном росте риса, усиливая экспрессию CYCA1;1 и CDC2Os-3 (Fabian *et al.*, 2000).

Брассиностероиды также выступают в роли позитивных регуляторов КЦ (Oh *et al.*, 2020). Эпибрассинолид повышает экспрессию CYCD3;1 и тем самым усиливает интенсивность деления клеток и может заменить цитокинин в каллусной и суспензионной культурах клеток *Arabidopsis* (Hu *et al.*, 2000). При этом, например, для клеток листа *Arabidopsis* брассиностероиды важны для процессов деления, растяжения и дифференцировки. Баланс между пролиферацией клеток и дифференцировкой зависит от уровня фитогормона и функционирования BRI1-зависимой (рецептор брассиностероидов) сигнальной системы (Zhiponova *et al.*, 2013).

1.2.3.3. Этилен в процессах роста и пролиферации клеток растений

В вегетативном росте этилен, по-видимому, играет двойную роль, стимулируя и ингибируя рост, в зависимости от вида, ткани и типа клеток, стадии развития, гормонального статуса и условий окружающей среды. Этилен, помимо того, что он является решающим фактором в контроле роста корней и побегов, может способствовать цветению, созреванию и опадению плодов, а также старению листьев и лепестков, их отмиранию и, следовательно, играет роль практически на всех этапах жизни растений (Van de Poel *et al.*, 2015).

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 (Pierik *et al.*, 2006; Polko *et al.*, 2011). Например, этилен способен стимулировать удлинение гипокотилия *Arabidopsis* на свету, в основном усиливая процессы растяжения клеток (Smalle *et al.*, 1997), действуя совместно с ауксином, этилен способствует росту корневых волосков (Pitts *et al.*, 1998), в зависимости от экотипа, этилен оказывает разное влияние на рост черешков листьев растений *Arabidopsis*, в том числе стимулирующее (Millenaar *et al.*, 2005), улучшает развитие корневой системы при кадмиевом стрессе путем модулирования концентрации супероксид-аниона в *Arabidopsis thaliana* (Abozeid *et al.*, 2017). Наконец, классическое влияние этилена у многих видов растений, часто в содружестве с гиббереллинами и АБК — быстрое вытягивание стебля в ответ на затопление (Sasidharan, Voesecek, 2015).

Тем не менее, когда этилен рассматривают как «гормон стресса», иного, чем затопление, он исправно выполняет функции ингибитора растяжения и деления клеток, в частности в тканях листа, что, безусловно, имеет важное адаптивное значение (Dubois *et al.*, 2018).

В настоящее время нет однозначного понимания значения этилена и в контроле пролиферации клеток.

С одной стороны, было показано, что этилен ингибирует репликацию ядерной ДНК и деление клеток в проростках гороха (Apelbaum, Burg, 1972; Rost, Sammut, 1982), индуцирует запрограммированную гибель культивируемых клеток табака в определенные периоды клеточного цикла, правда, при очень больших концентрациях — 17700–35000 мкл/л, превышающих на три-четыре порядка физиологические концентрации этилена (Herbert *et al.*, 2001), ингибирует пролиферацию клеток в меристеме корня *Arabidopsis* (Street *et al.*, 2015).

С другой стороны, было продемонстрировано, что этилен стимулирует клеточные деления в черешках болотноцветника щитолистного (*Nymphoides*

peltata) (Ridge, Amarasinghe, 1984), индуцирует синтез ДНК и эндоредупликацию, но ингибирует цитокинез в эпидерме гипокотилей огурца (Dan *et al.*, 2003), стимулирует деление клеток покоящегося центра меристемы корней *Arabidopsis* (Ortega-Martínez *et al.*, 2007), стимулирует деление клеток эпидермы этиолированных гипокотилей огурца после кратковременного воздействия (Kazama *et al.*, 2004), активирует пролиферацию камбиальных клеток тополя (Love *et al.*, 2009), клеток покоящегося центра меристемы корней кукурузы после удаления кончика корня (Быстрова *с соавт.*, 2015) и в кооперации с рецепторной киназой РХУ способствует увеличению скорости делений в «васкулярной» меристеме при формировании флоэмы (Etchells *et al.*, 2012).

Таким образом, влияние этилена на пролиферацию клеток растений остаётся далёким от понимания и в связи с этим исследования в этом направлении представляют существенный научный интерес.

1.3. Этилен — открытие гормональных функций, биосинтез и сигнальный путь

Этилен — простейший алкен (олефин), газообразная сигнальная молекула, влияющая на многие аспекты роста и развития растений (Bakshi *et al.*, 2015). 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 (Abeles *et al.*, 1992; McManus, 2012). Этилен участвует в гравитропических реакциях, в частности через реорганизацию актинового цитоскелета (Pozhvanov *et al.*, 2016; Pozhvanov *et al.*, 2021).

Участие этилена в регуляции роста растений было открыто Дмитрием Николаевичем Нелюбовым в Санкт-Петербургском университете в 1901 году. На 11-ом съезде русских естествоиспытателей и врачей Д. Н. Нелюбов сделал доклад «Об изменении геотропических свойств стеблей под влиянием некоторых газов», в

котором он сообщил, что «...мы встречаемся с совершенно новым влиянием газов ацетилена и этилена, они как будто заставляют стебли принимать горизонтальное направление...».

Поэтому именно 1901-й год считается годом открытия гормональных функций газа этилена.

Основная цель исследований Д. Н. Нелюбова заключалась в изучении влияния условий внешней среды на ростовые движения проростков и выяснении причин, из-за которых растения не могли нормально расти и развиваться в лабораторных условиях. Следует отметить, что в те годы в лабораторном воздухе всегда имелось небольшое количество светильного газа. Д. Н. Нелюбов исследовал зависимость направления роста стеблей от температуры, света, влажности, газового состава и пришел к выводу, что стебли начинают переходить к горизонтальному росту только в том случае, когда «к чистому воздуху добавляется светильный газ». Д. Н. Нелюбов впервые установил, что этилен в очень низких концентрациях вызывал так называемый «тройной эффект» — он подавлял рост стебля в длину, вызывал его утолщение и изгиб в горизонтальном направлении (Neljubow, 1901; Нелюбов, 1901). Позднее было показано, что этилен стимулирует преждевременное опадение листьев (Doubt, 1917), а сами растения могут синтезировать эндогенный этилен (Gane, 1934).

В течение 120 лет с момента открытия гормональных функций этилена установлен широкий спектр его влияния на растения. В настоящее время активно исследуются молекулярные механизмы действия этилена. Открыты многие ключевые компоненты, участвующие в восприятии и передаче сигнала этилена, в том числе благодаря широкому использованию мутантов модельного растения *Arabidopsis thaliana*. Множество работ посвящено исследованию взаимодействия путей передачи сигнала этилена и других фитогормонов, поиску экспериментальных подтверждений наличия альтернативных сигнальных путей этилена, выявлению тканевой и клеточной специфичности его эффектов.

1.3.1. Биосинтез этилена

В настоящее время биосинтез этилена хорошо изучен (Рис. 8).

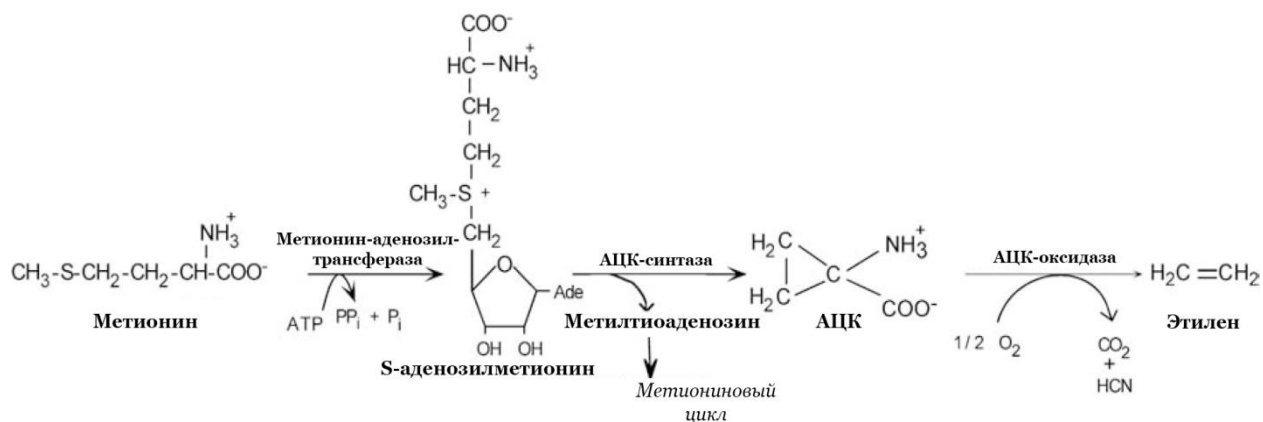


Рис. 8. Биосинтез этилена.

В растениях он начинается с превращения аминокислоты метионина под действием фермента метионин-аденозилтрансферазы в S-аденозилметионин (Adams, Yang, 1979), который затем благодаря ферменту АЦК-синтазе (АЦС) даёт начало 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоте (АЦК). АЦК в присутствии фермента аминокциклопропанкарбоксилат-оксидазы (АЦК-оксидазы) разлагается с образованием этилена, CO₂ и HCN (Peiser *et al.*, 1984; Kende, 1993). Детоксикация цианида, получающегося в результате этой реакции, до β-цианоаланина осуществляется с помощью фермента β-цианоаланинсинтазы, предотвращая тем самым токсические эффекты на растение в условиях высокой скорости биосинтеза этилена (Huang *et al.*, 2013). Вторым продуктом реакции с участием АЦК-синтазы является 5'-метилтиоаденозин, который затем снова используется для синтеза метионина (Miyazaki, Shang, 1987). Это сохраняет метилтиогруппы, что позволяет поддерживать высокие темпы биосинтеза этилена даже при небольшом пуле свободного метионина (Bleecker, Kende, 2000).

Не смотря на кажущуюся простоту этого процесса по сравнению с синтезом других фитогормонов, изучение его осложняется существованием изоформ как АЦК-синтазы, так и АЦК-оксидазы (Moshkov *et al.*, 2008). Существуют

специфические стимулы, активирующие экспрессию генов различных изоформ АЦК-синтазы, например ауксины и поранение; но эта экспрессия может в свою очередь модулироваться также и другими факторами — собственно этиленом, абсцизовой кислотой, цитокининами, углекислым газом и светом (Moshkov *et al.*, 2008). Следовательно, любые механические манипуляции с растениями, изменения условий окружающей среды или условий культивирования клеток *in vitro* может влиять на синтез этилена.

Arabidopsis имеет восемь генов, кодирующих активные АЦС-белки, и дополнительный ген, кодирующий каталитически неактивный белок ACS1 (Liang *et al.*, 1992). Показано, что гены *ACS2*, *ACS6*, *ACS7* и *ACS9* индуцируются при гипоксии (Peng *et al.*, 2005); *ACS2*, *ACS6*, *ACS7*, *ACS8* и *ACS11* вовлечены в биосинтез этилена при биотическом стрессе (Li *et al.*, 2012). Выделяют три типа АЦК-синтаз (Chae, Kieber, 2005). Белки первого типа содержат три консервативных сериновых остатка, которые являются мишенями для фосфорилирования митоген-активируемой протеинкиназой 6 (MPK6) (Liu, Zhang, 2004) и консервативный остаток серина, который представляет собой сайт фосфорилирования для кальций-зависимой протеинкиназы (CDPK) (Tatsuki, Mori, 2001; Sebastià *et al.*, 2004). Второй тип имеет только сайт фосфорилирования для CDPK. Третий тип АЦС-белков имеют короткую С-концевую часть и не содержит сайтов фосфорилирования. Белки АЦК-синтаз могут образовывать как гомо-, так и гетеродимеры, что увеличивает возможности регулирования биосинтеза этилена в зависимости от разных воздействий окружающей среды (Tsuchisaka, Theologis, 2004; Tsuchisaka *et al.*, 2009). Иными словами, такая избыточность генов АЦК-синтаз обеспечивает биохимическую и метаболическую гибкость растений (Tourasse, Li, 2000).

Стресс-активируемые МАП-киназы (MPK3/6) вызывают увеличение фосфорилирования специфических изоформ АЦК-синтаз что приводит к увеличению продукции этилена (Liu, Zhang, 2004; Sebastià *et al.*, 2004; Joo *et al.*,

2008; Han *et al.*, 2010). Также, важную роль в работе этих ферментов играет и дефосфорилирование (Skottke *et al.*, 2011).

Следует также отметить, что этилен может иметь как автокаталитический эффект, так и эффект автоингибирования на собственный синтез в зависимости от ткани или вида растений (McKeon *et al.*, 1995).

1.3.2. Сигнальный путь этилена

Сигнальный путь этилена начинается с его восприятия трансмембранными рецепторными белками, объединёнными в гомо- или гетеродимеры (Wang *et al.*, 2013). У *Arabidopsis* существует пять рецепторов этилена: ethylene response 1 (ETR1), ETR2, ethylene response sensor 1 (ERS1), ERS2 и ethylene insensitive 4 (EIN4) (Chang *et al.*, 1993; Schaller, Bleecker, 1995; Hua *et al.*, 1998; Hua, Meyerowitz, 1998; Sakai *et al.*, 1998; Hall *et al.*, 2000) Рецепторы этилена у *Arabidopsis* структурно различны и могут быть разделены на два подсемейства (Рис. 9): подсемейство I содержит ETR1 и ERS1 и подсемейство II включает в себя ETR2, EIN4 и ERS2 (Gamble *et al.*, 1998; Moussatche, Klee, 2004; Shakeel *et al.*, 2013). Рецепторы обоих подсемейств содержат три консервативных трансмембранных домена вблизи N-конца белковой молекулы, которые формируют этилен-связывающий сайт. Затем следует GAF-домен, который отвечает за белок-белковые взаимодействия. На С-конце рецептора ETR1 расположен функционально активный гистидинкиназный домен, рецепторы ETR2, EIN4 и ERS2 обладают Сер/Тре-киназной активностью *in vitro*, а ERS1 демонстрирует *in vitro* Сер/Тре-киназную или гистидинкиназную активность в зависимости от ионного окружения (Moussatche, Klee, 2004; Binder, 2020). Однако необходимость функционирования рецепторных протеинкиназ для проведения сигнала этилена — вопрос дискуссионный (Lacey, Binder, 2014).

Кроме того, ETR1, EIN4 и ETR2 содержат также ресиверный домен (Hua *et al.*, 1998; Shakeel *et al.*, 2013). Такая структура С-концевой части рецепторов соответствует распространённым среди прокариотов двухкомпонентным

сигнальным элементом. Предполагается, что рецепторы этилена произошли от бактериальных или дрожжевых двухкомпонентных регуляторов которые имеют аналогичные домены с гистидинкиназной активностью (Bleecker, Kende, 2000; Chang, Stadler, 2001; Lohrmann, Harter, 2002; Carlew *et al.*, 2020). Наконец, рецепторы подсемейства II имеют дополнительный трансмембранный домен (Shakeel *et al.*, 2013).

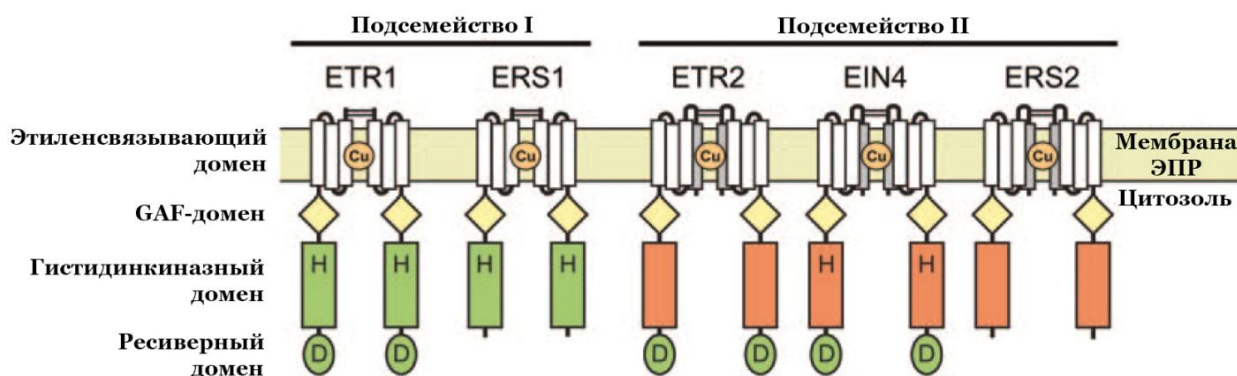


Рис. 9. Доменная структура рецепторов этилена у *Arabidopsis*. Рецепторы показаны в виде гомодимеров и расположены в мембранах ЭПР. Этиленсвязывающие сайты локализованы в трансмембранных доменах (белые прямоугольники) и включают одновалентные ионы меди. Подсемейство II имеет дополнительный трансмембранный домен (серый прямоугольник). GAF-домен (жёлтый ромб) участвует в белок-белковых взаимодействиях. Функционально активные гистидинкиназные домены маркированы зелёным цветом, а неактивные — оранжевым. Ресиверные домены имеют каноническую структуру. Отмечено наличие консервативных сайтов фосфорилирования гистидина (H) и аспарагиновой кислоты (D). По (Shakeel *et al.*, 2013).

Образование димерной формы рецепторов важно для их функционирования, поскольку этилен-связывающий сайт формируется только в димере. В качестве кофактора для связывания этилена с рецепторами необходимы два иона одновалентной меди на димер (Schott-Verdugo *et al.*, 2019).

Рецепторы этилена работают как негативные регуляторы, активно подавляя этиленовый ответ в отсутствие гормона (Hua, Meyerowitz, 1998). Хотя принято считать, что рецепторы в значительной степени избыточны в контроле ответа на

этилен, была обнаружена определённая функциональная специфичность среди изоформ (Merchante *et al.*, 2013; Shakeel *et al.*, 2013; Bakshi *et al.*, 2018) (Рис. 10).

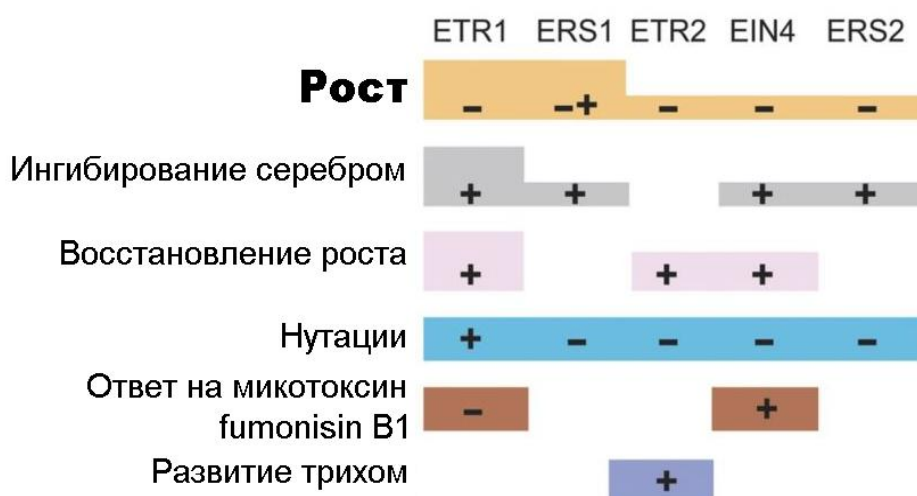


Рис. 10. Роль отдельных рецепторов в этилен-индуцированных ответах. Знак «+» указывает на то, что рецептор активирует ответ, знак «-», что рецептор ингибирует ответ и оба знака «-+», что рецептор влияет на различные эффекты, зависящие от других факторов. Отсутствие знака указывает на то, что рецептор не оказывает наблюдаемого эффекта. Различия в высоте цветной части показывают вклад рецептора в конкретный ответ. По (Shakeel *et al.*, 2013).

Рецепторы локализованы в мембране эндоплазматического ретикулума (ЭПР). Учитывая, что газообразный этилен может свободно диффундировать как в водных, так и липидных средах клетки, то подобная локализация рецепторов может облегчать их взаимодействие с другими клеточными компонентами или же обеспечивать интеграцию с другими сигнальными путями (Ju, Chang, 2012). Важно отметить, что рецепторы, взаимодействуя между собой и с другими локализованными в ЭПР белками сигнального пути этилена, которые мы рассмотрим ниже, способны формировать кластеры. При таком способе функционирования рецепторов появляется возможность воспринимать этилен в широком диапазоне концентраций (Liu, Wen, 2012).

Генетические исследования показывают, что в отсутствие этилена рецепторы активируют белок CTR1 (Constitutive Triple Response1), также являющийся

негативным регулятором сигнального пути (Kieber *et al.*, 1993). CTR1 — представитель Raf-подобных серин-треониновых протеинкиназ, который образует димеры при активации (Huang *et al.*, 2003; Mayerhofer *et al.*, 2012). Киназная активность CTR1 необходима, поскольку в отсутствие этилена CTR1 блокирует сигнальные события, осуществляемые белками, функционирующими после него в пути передачи этиленового сигнала. У CTR1 отсутствуют какие-либо трансмембранные домены, однако он также ассоциирован с мембраной ЭПР благодаря его физическому взаимодействию с рецепторами (Gao *et al.*, 2003; Zhong *et al.*, 2008). Эта физическая ассоциация с рецепторными белками является критичной для индукции киназной активности CTR1. Механизм активации CTR1 рецепторами этилена, до сих пор полностью не раскрыт (Bakshi *et al.*, 2015). Активированные киназные димеры CTR1 участвуют во взаимодействиях, которые могут обеспечивать «общение» (crosstalk) между кластерами этиленовых рецепторов (Mayerhofer *et al.*, 2012).

Следующим после CTR1 ключевым элементом в каскаде передачи этиленового сигнала является EIN2 (Ethylene Insensitive). Все изученные мутанты *ein2* имеют нарушенный ответ на этилен (Alonso *et al.*, 1999). Белок EIN2 состоит из гидрофобной области N-концевого участка — 12 трансмембранных доменов и гидрофильного С-конца, который несёт в себе консервативную сигнальную последовательность для ядерной локализации (Alonso *et al.*, 1999; Wen *et al.*, 2012), но не содержит других узнаваемых функционально-определённых структур. Гидрофобный домен имеет сходство с NRAMP-семейством транспортёров ионов металлов, хотя транспортная активность не была показана для EIN2 (Wen *et al.*, 2012). EIN2 находится в мембране ЭПР и физически взаимодействует с киназным доменом рецепторов этилена и CTR1 (Bisson, Groth, 2010; Ju *et al.*, 2012; Cho, Yoo, 2015).

Действующая каноническая модель (Рис. 11) сигнального пути этилена указывает на то, что в отсутствие этилена его рецепторы «держат» CTR1 в активном состоянии и CTR1 непосредственно фосфорилирует EIN2, что приводит

к убиквитинированию EIN2 и последующему протеолизу протеасомой 26S. Последствием таких событий является убиквитинирование и протеолиз факторов транскрипции EIN3, EIL1 и EIL2, что предотвращает ответы на этилен (Ju *et al.*, 2012; Ju, Chang, 2012; Binder, 2020).

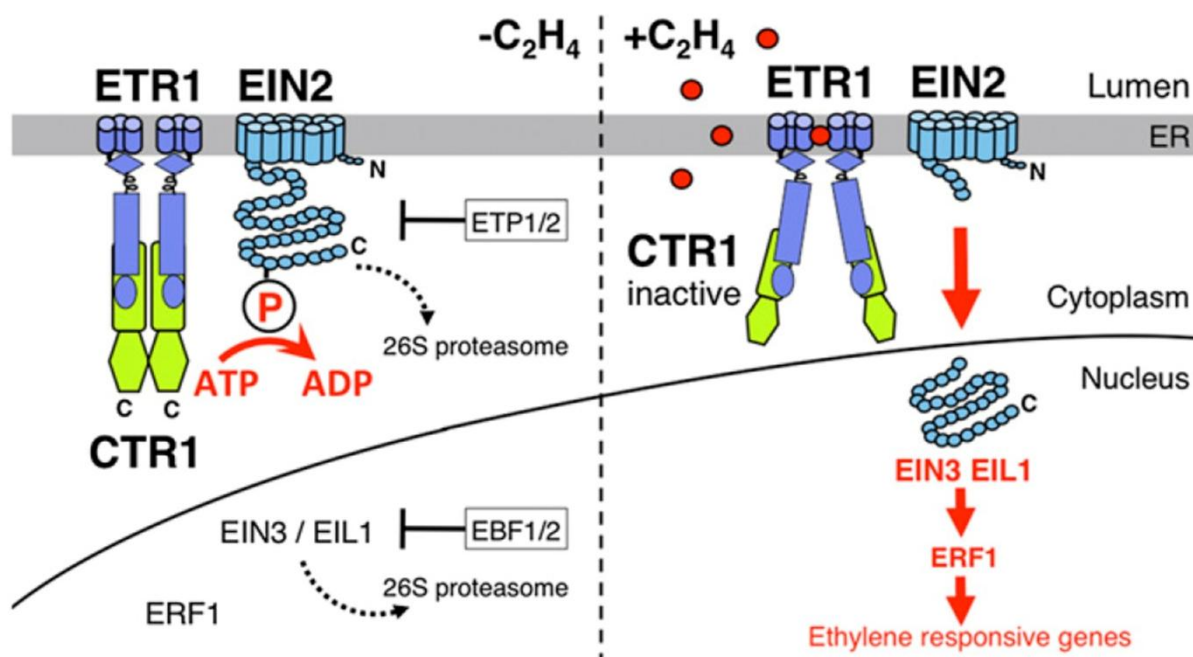


Рис. 11. Каноническая модель этиленового сигналинга. В отсутствие этилена (слева) рецепторы этилена (например, ETR1) на мембране ЭПР активируют протеинкиназу CTR1, димер, который фосфорилирует С-концевой домен EIN2, предотвращая его ядерную локализацию. Без этилена EIN2 подвергается протеасомной деградации 26S F-бокс-белками ETP1/2. Факторы транскрипции EIN3/EIL1 также подвергаются деградации F-бокс-белками EBF1/2. В присутствии этилена (справа) рецепторы инактивируются, и поэтому киназа CTR1 больше не активна. Отсутствие фосфорилирования на EIN2 приводит к отщеплению С-конца EIN2 и его локализации в ядре, где он может активировать нижестоящий транскрипционный каскад. По (Ju *et al.*, 2012).

В присутствии этилена рецепторы ингибируются, что приводит к меньшему фосфорилированию EIN2 с помощью CTR1 (Рис. 11). Считается, что при снижении фосфорилирования EIN2 не происходит его масштабного убиквитинирования. На этом фоне происходит расщепление EIN2 неизвестной протеазой с высвобождением С-концевой части (EIN2-C) с последующей её транслокацией в

ядро, где EIN2-С приводит к стабилизации транскрипционных факторов EIN3/EIL1/EIL2 и активации этиленового ответа (An *et al.*, 2010; Ju *et al.*, 2012; Ju, Chang, 2012; Wen *et al.*, 2012; Ji, Guo, 2013). Увеличение активности EIN3, EIL1 и EIL2, вызванное EIN2-С приводит к изменению транскрипции других генов отвечающих на этилен, включая другие факторы транскрипции, такие как ERF (Ethylene Response Factor) (Solano *et al.*, 1998; Lorenzo, 2003). При этом конститутивная экспрессия *ERF1* приводит к активации различных генов ответа на этилен и проявлению этиленового фенотипа (Solano *et al.*, 1998).

Интересно, что сверхэкспрессия С-терминального конца EIN2 конститутивно активирует этиленовый ответ в выращенных на свету растениях, что, однако, не позволяет в полной мере восстановить чувствительность к этилену у *ein2* мутантов (Alonso *et al.*, 1999; Merchante *et al.*, 2013).

В нескольких независимых работах было продемонстрировано физическое перемещение С-конца белка EIN2 из мембраны ЭПР в ядро для передачи сигнала этилена нижележащим компонентам сигнального каскада, таким как транскрипционные факторы EIN3/EIL1 (Ju *et al.*, 2012; Qiao *et al.*, 2012; Wen *et al.*, 2012). На этиолированных проростках *Arabidopsis* при обработке их этиленом было выявлено, что восприятие этилена приводит к быстрым протеомным изменениям, которые являются важной частью сигналинга, кроме того, авторы показали возможное регулирование активности и стабильности EIN2 посредством фосфорилирования этого белка (Chen *et al.*, 2011).

Вторая важная функция EIN2-С заключается в связывании мРНК, кодирующих F-бокс-белки EBF1/2, после чего комплекс белок/РНК взаимодействует с процессинговыми тельцами (P-bodies). Это приводит к деградации этих мРНК экзорибонуклеазой XRN4 (также известной как EIN5), следствием разрушения мРНК EBF1 и EBF2 является уменьшение протеолиза EIN3 и EIL1 и, вероятно, EIL2, что приводит к усилению передачи сигналов этилена (Li *et al.*, 2015; Merchante *et al.*, 2015; Salehin, Estelle, 2015).

Наконец, следует отметить, что для адаптации растений к широкому диапазону концентраций этилена работают два противоположных процесса, контролирующих уровни комплексов рецептор/CTR1. Этилен стимулирует производство новых комплексов в основном за счет индукции транскрипции генов рецепторов. Однако этилен также вызывает оборот (turnover) рецепторов, так что уровни комплексов рецептор/CTR1 снижаются при более высоких концентрациях этилена (Shakeel *et al.*, 2015).

Обсуждаемая выше модель (Рис. 11) в значительной степени линейна и суммирует основной путь проведения сигнала этилена. Однако активно рассматриваются и другие возможности этиленового сигналинга. Один из вариантов связан с различием в ферментативной активности рецепторов подсемейства I и II. Рецепторы подсемейства I ETR1 и ERS1 обладают гистидинкиназной активностью, в отличие от рецепторов подсемейства II (Gamble *et al.*, 1998; Moussatche, Klee, 2004). Гистидинкиназная активность ETR1 и ERS1 позволяет им потенциально участвовать в многоступенчатой передаче фосфатной группы (phosphorelay) с участием белков АНР (ARABIDOPSIS HISTIDINE-CONTAINING PHOSPHOTRANSMITTER) и факторов транскрипции ARR (ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR) типа В (Street *et al.*, 2015). Роль механизма «phosphorelay» подробно охарактеризована в передаче сигнала цитокининов (Kieber, Schaller, 2014). Однако вероятность функционирования такого пути (Рис. 12, а) в части ответов на этилен имеет экспериментальные подтверждения (Street *et al.*, 2015; Zdarska *et al.*, 2015; Zdarska *et al.*, 2019; Binder, 2020). Вероятно, наиболее прямые доказательства участия механизма «phosphorelay» в передаче сигналов этилена получены в экспериментах с транзientной экспрессией на протопластах мезофилла *Arabidopsis*, которые показали что регулятор ответа В-типа ARR2 связывается с GAT-box-последовательностями в промоторе гена *ERF1*. Это способствует усилению экспрессии *ERF1* и, в свою очередь, приводит к активации различных генов ответа на этилен (Hass *et al.*, 2004). При этом сигнал от рецепторов этилена разветвляется

на выходе и конечный эффект может зависеть как от канонического пути (CTR1/EIN2/EIN3), так и от «phosphorelay» пути (AHP/ARR) или иметь определённый вклад от обоих путей (Рис. 12, б) (Binder *et al.*, 2018).

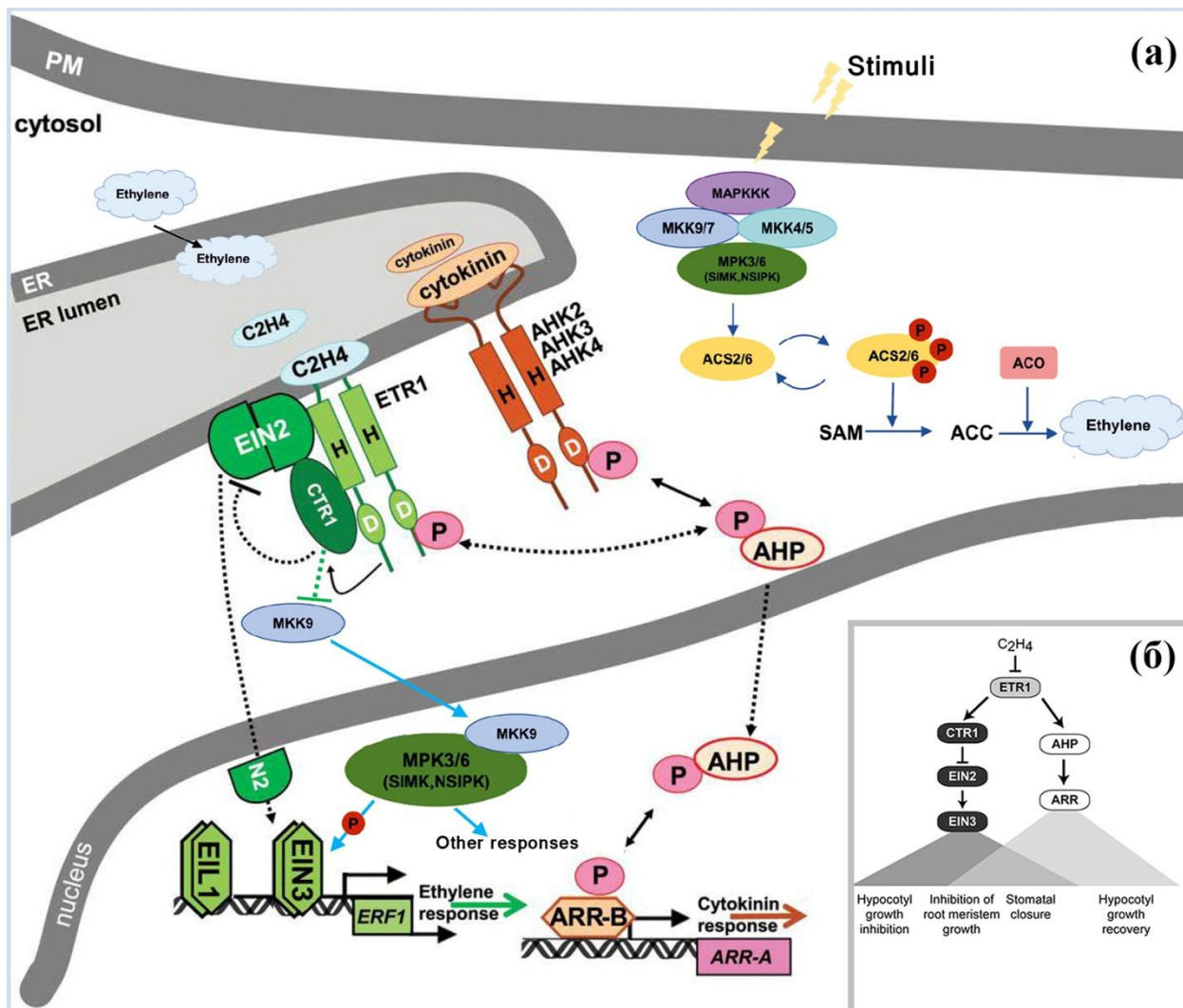


Рис. 12. Взаимосвязи «канонического» и возможных альтернативных путей передачи сигнала этилена. Связь между сигнальными путями цитокинина и этилена: (а) — Связывание цитокининов (ЦК) с рецепторными белками АНК запускает «phosphorelay» путь. От АНК «фосфорильные» сигналы передаются через АНР в ядро, где ARR-В фосфорилируются и активируют экспрессию генов первичного ответа на ЦК. Этилен воспринимается расположенными в ЭПР (ER) рецепторами (ETR1 и др.), что подавляет их активность и Сер/Тре-киназную активность CTR1. С-концевая часть нефосфорилированного EIN2 отщепляется и перемещается в ядро, что приводит к стабилизации EIN3/EIL1, которые регулируют экспрессию генов, чувствительных к этилену. ETR1 взаимодействует с АНР, который фосфорилирует ARR-В, в частности ARR2, что способствует регуляции *ERF1* и, следовательно, экспрессии этилен-индуцируемых генов (Hass *et al.*, 2004). (б) — При этом конечный эффект может зависеть как от

«канонического» пути, так и от «phosphorelay» пути или иметь вклад от обоих путей. МАРК-каскады в регуляции биосинтеза этилена и передачи его сигнала: (а) — Внешний стимул приводит к активации биосинтеза этилена через каскад МКК9-МРК3/МРК6. Активная МРК6 фосфорилирует АЦК-синтазы (ACS2/ACS6), которые инициирует биосинтез АЦК и затем образуется этилен в результате работы АЦК-оксидаз (АСО). После связывания этилена с рецепторами происходит ингибирование активности СТР1 (МККК), что приводит к освобождению МКК9 и перемещению в ядро, где она активирует МРК3/МРК6, которые стабилизируют факторы транскрипции EIN3/EIL1. По (Zdarska *et al.*, 2015) с добавлениями из (Yoo *et al.*, 2008; Binder *et al.*, 2018; Jagodzic *et al.*, 2018) с модификациями.

В клетках животных для передачи различных сигналов широко используются консервативные регуляторные модули — МАРК-каскады, посредством которых, информация передаётся в ядро, где индуцируется экспрессия генов ответа на поступивший сигнал. МАРК-каскад состоит из трёх функционально связанных протеинкиназ, последовательно фосфорилирующих друг друга. В этом модуле работают МАРККК (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase), которые фосфорилируют МАРКК (МКК), которые фосфорилируют терминальную МАРК (МРК), которая переместившись в ядро фосфорилирует факторы транскрипции, либо в цитозоле фосфорилируют свои различные субстраты. Активация МАРККК происходит после того как рецептор связал свой лиганд. Как уже отмечалось выше, хорошо показано, что каскад МКК9-МРК3/МРК6 участвует в регуляции биосинтеза этилена (Рис. 12, а) через фосфорилирование определённых изоформ АЦК-синтаз (Liu, Zhang, 2004; Sebastia *et al.*, 2004; Joo *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2010) и на уровне экспрессии их генов (Li *et al.*, 2012).

В пути передачи сигнала этилена после рецепторов этилена работает белок СТР1, имеющий сходства с Raf-подобными МАРККК клеток высших эукариот (Kieber *et al.*, 1993). После того как выяснили, что СТР1 не функционирует как элемент МАРК-каскада, а вместо этого инактивирует EIN2 путем фосфорилирования, были предприняты обширные усилия для идентификации МАРК-каскадов, участвующих в передаче сигналов этилена (Ju *et al.*, 2012; Qiao

et al., 2012; Wen *et al.*, 2012; Cho, Yoo, 2015). Первыми исследованиями в этом направлении были эксперименты Новиковой Г. В. с коллегами, которые показали, что белковый экстракт, полученный из растений *Arabidopsis* дикого типа, обработанных этиленом, демонстрировал активность MAPK, и что эта активность была выше у растений *ctr1* (нокаут) и ниже у мутантных растений *etr1* (нечувствительных к этилену) (Novikova *et al.*, 2000). Иммунопреципитация экстрактов арабидопсиса с использованием антител, специфичных к MAPK ERK1 млекопитающих, выявила предполагаемую MAPK с молекулярной массой 47 кД (Novikova *et al.*, 2000). В настоящее время предполагают, что МКК9 освобождается от ингибирования CTR1 и перемещается в ядро, где активирует МРК3 и МРК6 (Рис. 12, а), которые стабилизируют факторы транскрипции EIN3/EIL1. Фосфорилирование EIN3 в положении T174 блокирует его протеосомную деградацию и позволяет активировать этилен-чувствительные гены (Yoo *et al.*, 2008; Jagodzick *et al.*, 2018).

Безусловно, альтернативные сигнальные пути этилена, в том числе участие каскада МКК9-МРК3/6 должны быть тщательно изучены с помощью точно контролируемых экспериментов, однако их существование уже имеет большую доказательную базу и говорит о важности этилена в жизни клеток растений.

1.3.3. Мутанты растений *Arabidopsis thaliana*, связанные с сигнальным путём этилена

Важную роль в идентификации и выяснении роли отдельных компонентов этиленового сигнального пути играют различные мутанты по генам белков, вовлечённых в рецепцию и передачу сигнала (McCourt, 1999). Многие компоненты идентифицированы при молекулярно-генетическом анализе мутаций, которые приводят к проявлению этилен-нечувствительного фенотипа (Bleecker *et al.*, 1988; Chang *et al.*, 1993; Hua *et al.*, 1995; Hua *et al.*, 1998; Sakai *et al.*, 1998).

Мутанты по гену, кодирующему Ethylene Response1

Доминантные мутации в гене *ETR1* из *Arabidopsis* были выявлены по неспособности выращенных в темноте растений к характерному «тройному ответу» в присутствии этилена (замедление роста в длину и утолщение проростка, «не разгибающаяся» апикальную петельку, изменение ориентации проростка в пространстве) (Bleecker *et al.*, 1988). Другие фенотипические проявления, связанные с мутацией *etr1*, заключаются в плохом прорастании семян, снижении экспрессии этилен-индуцируемых генов в вегетативных тканях. Ген *ETR1* кодирует белок сходный с бактериальными двухкомпонентными гистидинкиназами (Chang *et al.*, 1993). В отличие от своих бактериальных аналогов, в *Arabidopsis* и киназный, и ресиверный домены локализованы на С-конце белка ETR1. Все мутации *etr1* сосредоточены в N-концевой области белка, который содержит этилен-связывающий мотив (Schaller, Bleecker, 1995; Gamble *et al.*, 1998; Imamura *et al.*, 1998).

Четыре ETR1-подобные киназы были клонированы в *Arabidopsis* и мутации в каждом из этих генов приводили к этилен-нечувствительности в растении (Hua *et al.*, 1995; Hua *et al.*, 1998; Hua, Meyerowitz, 1998; Sakai *et al.*, 1998).

Нечувствительность к этилену мутантов *etr1* при наличии других рецепторных белков дикого типа говорит о том, что ETR1-подобные белки функционируют как негативные регуляторы ответа на этилен в отсутствие гормона. Этилен ингибирует работу ETR1 дикого типа, в то время как мутанты *etr1* не связывают этилен, а, следовательно, показывают доминантную нечувствительность.

У мутанта *etr1-1* произошла замена Цис65 на Тир во втором трансмембранном домене в составе этилен-связывающего сайта рецептора ETR1 (Chang *et al.*, 1993). Поскольку в высоко аффинном связывании этилена с ETR1 участвуют катионы Cu(I), которые взаимодействуют с консервативными аминокислотными остатками Цис65 и Гис69, то мутантный вариант ETR1 потерял способность связывать этилен из-за невозможности координировать поведение

катионов Cu(I). Кроме *etr1-1* имеются еще три варианта доминантных точечных мутаций в *ETR1*, проявляющиеся в этиленсвязывающей способности рецептора.

Мутанты по гену, кодирующему Constitutive Triple Response1

Рецессивные мутанты *ctr1* растений *Arabidopsis* выращенные в темноте проявляют фенотип «тройного ответа» и конститутивно высокий уровень экспрессии этилен-регулируемых генов в отсутствие этилена (Kieber *et al.*, 1993). Мутантные растения имеют компактную карликовую розетку и маленькие корни. Подобный фенотип может быть получен на растениях *Arabidopsis* дикого типа при выращивании в атмосфере, содержащей этилен. Тот факт, что *ctr1* мутанты не являются сверхпродуцентами этилена предполагает, что CTR1 работает как негативный регулятор. Поэтому, потеря функциональной активности этим белком при мутации ведёт к конститутивному «этиленовому» фенотипу (McCourt, 1999). Молекулярный анализ аллелей *ctr1* с потерей функции показал, что часть из них имеет мутации нарушающие каталитический домен киназы, что указывает на то, что киназная активность необходима для функции CTR1. Одна миссенс-мутация, *ctr1-8*, как было обнаружено, является результатом аминокислотной замены в N-концевом домене; *ctr1-8* не оказывает заметного влияния на киназную активность CTR1 *in vitro*, а скорее нарушает взаимодействие с рецептором этилена ETR1. Очевидно, что белок-белковые взаимодействия CTR1 с рецепторами также важны для выполнения функций в этиленовом сигнальном пути (Huang *et al.*, 2003).

Мутанты по гену, кодирующему Ethylene Insensitive2

Название ген *EIN2* (*Ethylene Insensitive2*) получил по мутантным аллелям, в той или иной степени утратившим чувствительность к этилену. Белок EIN2 имеет выраженную «бипартитную» структуру: гидрофобный N-конец с 12 трансмембранными спиралями (аминокислоты 1–458) и большой гидрофильный C-конец (аминокислоты 459–1294), который содержит консервативную NLS последовательность (Alonso *et al.*, 1999; Wen *et al.*, 2012). Наиболее часто используемый мутант *ein2-1* был получен в 1990 г., когда химический мутагенез

(обработка этилметансульфонатом) и наблюдение за изменением реакции этилированных проростков на этилен («тройной ответ») использовали для выделения не отвечающих на этилен мутантов *Arabidopsis thaliana*; следует отметить, что фенотип мутантных проростков в присутствии этилена был сходен с проростками дикого типа выращенными в воздухе, но отличался большей высотой (кстати аналогичный фенотип для *ein2-1* зафиксирован во многих работах) (Guzman, Ecker, 1990). Тогда же авторы разместили локус *ein2-1* на четвёртой хромосоме, используя RFLP-анализ. В 1995 г. дополнительное картирование позволило разместить *ein2-1* вверху пятой хромосомы (Roman *et al.*, 1995). В мутанте произошла замена С на Т в позиции 3343 (полногеномная ДНК) с образованием stop-кодона.

1.4. Культивируемые клетки растений — объект для цитофизиологических исследований

Термин «культура клеток растений» охватывает многие типы стерильно выращиваемых культур, в том числе каллусные культуры, получаемые из сегментов или частей различных органов растений и выращиваемые на агаризованной среде, а также суспензионные культуры клеток. «Суспензионные культуры клеток» — это клетки и клеточные агрегаты, диспергированные в движущейся жидкой среде (не существует культур, состоящих полностью из отделенных клеток). Под «культурами клеток» понимают более общий термин, обозначающий любую систему с более низким уровнем организации, чем культуры тканей (Street, 1977).

Культивируемые *in vitro* клетки растений — экспериментально созданные популяции соматических клеток, лишённые управляющих связей целого организма — представляют особый теоретический интерес для исследований в области цитофизиологии, биохимии и молекулярной биологии клеток растений. Условия при выращивании клеток строго контролируются, что позволяет исследовать влияние одного фактора на какой-либо процесс.

Первые работы по культуре клеток и тканей растений (20-е – 30-е годы прошлого века) позволили накопить значительный опыт, который воплотился во множестве публикаций: значимым событием было появление классической отечественной работы Раисы Георгиевны Бутенко — «Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений» (Бутенко, 1964).

1.4.1. Исследование пролиферации и клеточного цикла в культурах клеток растений

Исследования таких клеточных линий, как HeLa (Gey *et al.*, 1952) сыграли важную роль в понимании молекулярной и клеточной биологии млекопитающих. Подобную роль в экспериментальной биологии клеток растений играет одна из самых популярных модельных систем — клеточная линия табака BY-2, полученная Тошиюки Нагата (Nagata *et al.*, 1992; Nagata *et al.*, 2004; Nagata *et al.*, 2006). Эта и аналогичные ей суспензионные культуры позволяют исследовать деление клеток в отсутствие процессов дифференциации, обеспечивая однородную популяцию почти идентичных по фенотипу клеток (Gould, King, 1984). В тоже время, в определённых экспериментальных условиях суспензионные культуры клеток могут служить и как модель цитодифференцировки (Miyazawa, Sakai, 2006).

Эффективные протоколы синхронизации таких культур обеспечивают исследователей материалом, представляющим собой клетки, находящиеся в определённых фазах КЦ. Это может быть достигнуто либо удалением, либо удалением с последующим повторным добавлением веществ, необходимых для роста, таких как фосфат, нитрат, фитогормоны или углеводы (Menges, Murray, 2002; Kumagai-Sano *et al.*, 2007). При использовании препарата афидиколин для ингибирования ДНК-полимеразы (Sala *et al.*, 1980), клетки можно остановить в фазе G₁/S-перехода и после снятия блока уровень S-фазных клеток достигает 90%, и в дальнейшем наблюдается 45–50%-й митотический индекс (Sorrell *et al.*, 2001).

Исследование деления клеток BY-2 проводились уже и в космосе в рамках международного проекта в 2006 г. (Sieberer *et al.*, 2009).

Многие работы, в которых в качестве объекта для исследования КЦ использовали суспензионные культуры клеток, уже были рассмотрены в предыдущих разделах обзора литературы.

1.4.2. Этилен в культуре клеток

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 (Biddington, 1992; Moshkov *et al.*, 2008), а физиологические эффекты этилена обнаруживаются и при меньших на два-три порядка концентрациях (Neljubow, 1901; Abeles *et al.*, 1992). Показано, что продукция этилена связана с периодами активного роста культивируемых клеток и зависит от вида растений (Gamborg, Larue, 1971; Biddington, 1992). В исследовании с привлечением различных типов культур клеток, тканей и первичных эксплантов была показана продукция не только этилена, но и других летучих соединений (этан, ацетальдегид и этанол), количество которых зависело от генотипа и типа культуры (Thomas, Murashige, 1979).

В суспензионных культурах клеток на продукцию этилена может влиять концентрация ауксинов, содержащихся в среде культивирования, например 2,4-D (Mackenzie, Street, 1970).

Поскольку этилен выделяется клетками, он накапливается в газовой фазе в закрытых сосудах для культивирования. Концентрация в свободном воздушном пространстве может варьировать в зависимости от типа ткани, количества ткани, объема сосуда, способа, которым он закрыт, условий культивирования. В колбах этилен также может накапливаться в значительных количествах при обжигании газовой или спиртовой горелкой во время пересадок и культуральной работы (Beasley, Eaks, 1979).

Физиологические эффекты этилена, содержащегося в атмосфере культуральных сосудов, зависят от концентрации газа (Moshkov *et al.*, 2008). Например, увеличение концентрации этилена в газовой фазе на свободной от

других фитогормонов среде способствовало каллусообразованию у гинкго билоба (Webb *et al.*, 1986). Была обнаружена тесная связь между скоростью производства этилена и темпами роста каллусов табака (Bridgen, Lineberger, 1981), георгина (Gavinlertvatana *et al.*, 1982) и томата (Mukund *et al.*, 1988).

С другой стороны, было показано, что этилен ингибирует образование каллуса и пробковых клеток на поврежденных поверхностях корней картофеля (Chalutz, DeVay, 1969), а концентрация этилена выше 0.1 ppm предотвращает образование каллуса и трахеид у эксплантов латука (Zobel, Roberts, 1978).

Как отмечалось, культивируемые клетки часто находятся в атмосфере с высокой концентрацией этилена и это не влияет на их параметры роста. 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 (Lague, Gamborg, 1971; Biddington, 1992; Moshkov *et al.*, 2008).

Таким образом, учитывая наличие противоречивых данных о влиянии этилена на пролиферацию клеток растений, в том числе и культивируемых *in vitro*; спорных моментов, связанных с функционированием сигнального пути этилена; преимуществ суспензионных культур клеток в изучении процессов пролиферации, — можно считать исследования в этом направлении актуальными и представляющими существенный научный интерес.

Глава 2. Объекты и методы исследования

2.1. Объекты

Объектами исследования служили суспензионные культуры клеток *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh. четырех генотипов: дикого типа (экотип Columbia, Col-0) и мутантов *etr1-1*, *ctr1-1*, *ein2-1*. Семена растений были получены из Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC, Великобритания): Col-0 [N1092], *etr1-1* [N237], *ctr1-1* [N8057], *ein2-1* [N3071]. Для получения каллуса использовали полностью сформировавшиеся листья стерильно выращенных четырехнедельных растений. Первичный каллус выращивали на агаризованной среде MS (Murashige, Skoog, 1962), отбирали наиболее рыхлые участки каллуса и переносили в жидкую питательную среду Schenk и Hildebrandt (среда SH) (Schenk, Hildebrandt, 1972).

Суспензионные культуры клеток выращивали в 50 мл среды SH с 3% сахарозы, 1 мг/л 2,4-Д и 0.1 мг/л кинетина в стеклянных колбах объемом 250 мл, закрытых алюминиевой фольгой и крафт-бумагой, в темноте при температуре 26°C и постоянном перемешивании на орбитальном шейкере (100 качаний/мин). Период субкультивирования — 10 дней, объем инокулята: для Col-0 — 1 мл, *etr1-1* — 5 мл, *ctr1-1* — 10 мл, *ein2-1* — 2.5 мл.

А также использовали суспензионные культуры клеток из Всероссийской коллекции культивируемых клеток высших растений (ВКККВР ИФР РАН):

1. *Beta vulgaris* L., штамм 2n;
2. *Triticum timopheevii* (Zhuk.) Zhuk.;
3. *Panax ginseng* C.A. Mey., штамм PgL1 NB;
4. *Medicago sativa* L.;
5. *Dioscorea deltoidea* Wall., штамм ДМ-05, линия 3;
6. *Ajuga turkestanica* (Regel) Briq., линия 1;
7. Миксотрофный штамм *A. thaliana*;
8. *Euonymus maximoviczianus* Prokh.

Культивируемые клетки штаммов 1, 2, 7, 8 выращивали в среде SH с 3% сахарозы (1.5% для штамма 7), 1 мг/л 2,4-Д и 0.1 мг/л кинетина; культуры клеток штаммов 3–6 выращивали в среде MS 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 (штамм 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 7 постоянно освещали люминесцентными лампами с интенсивностью 200 мкмоль фотонов / (м² × с)) при температуре 26°C и постоянном перемешивании (120 качаний/мин). Период субкультивирования — 10 дней для штамма 7; 14 дней для штаммов 1–6 и 20 дней для штамма 8.

Семена *Vigna radiata* L. сорта Berken промывали, замачивали в теплой воде на 1 ч, снимали семенную кожуру и проращивали в течение суток в темноте при 25°C в ячейках 12-луночной плашки в небольшом объеме воды, покрывавшем не более половины семени.

Растения *Arabidopsis thaliana* дикого типа (Col-0) и мутанта *ein2-1* выращивали в почве в условиях фитотрона (+24°C, световой день 8 часов, освещали растения лампами Osram Plant Star 400 Вт, интенсивность света 120 мкмоль фотонов / (м² × с). У пятидневных растений брали листья 2–3 ярусов для электрофоретического анализа белков и исследования влияния 2,4-Д на синтез этилена.

2.2. Исследование ростовых характеристик

Для определения параметров роста суспензии клеток выращивали в серии колб. В течение субкультивирования периодически отбирали по три колбы, в которых определяли сырую массу клеток, их число и размеры, после высушивания при 37°C в течение 3 суток — сухой вес.

Число клеток оценивали по числу протопластов. Для выделения протопластов в стеклянных 100-миллилитровых стаканах смешивали равные

объемы суспензии клеток (обычно 5 мл) и подогретого до 28°C раствора, содержащего макросоли среды SH, 0.8 М сорбита, 8 мМ CaCl₂, 25 мМ Mes-KOH (pH 5.7), 2% целлюлазы Onozuka R10 (“Kinki Yakult”, Япония), 0.3% пектиназы Masecozyme R10 (“Kinki Yakult”), 0.8% гемицеллюлазы Driselase (“Fluka”). Раствор ферментов готовили заранее, осветляли центрифугированием и замораживали. Протопласты выделяли при 26°C на орбитальном шейкере (100 качаний/мин) в течение 1.0–1.5 ч.

Число протопластов подсчитывали в камере Фукса-Розенталя. Протопласты фотографировали и определяли их размеры по диаметру.

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

2.3. Цитофотометрическое определение количества ядерной ДНК

Клетки фиксировали смесью ледяной уксусной кислоты с 96% этанолом (1 : 3) в течение суток при 4°C и промывали три раза по 5 мин 70% этанолом. При окрашивании материала придерживались стандартного протокола, предложенного Greilhuber (Greilhuber, 2005). Клетки промывали дистиллированной водой 3 раза по 5 минут, затем выдерживали в течение часа в 5М HCl при 20°C. Далее промывали холодной дистиллированной водой, после удаления воды клетки заливали реактивом Шиффа (Filkuka, Kleinwächter, 1981) и оставляли в темноте на 1.5 часа при 20°C. После окрашивания клетки промывали сернистой водой (3 раза по 10 минут) и дистиллированной водой. Затем готовили давленные препараты и после гистологической проводки в серии спиртов и ксилола заключали их в DePeX (“Serva”, Германия). Цитофотометрический анализ проводили по протоколу (Zorinians *et al.*, 2003) двухволновым методом при $\lambda_1 = 502$ нм и $\lambda_2 = 565$ нм. Для расчета плоидности ядер клеток суспензионных культур по количеству ДНК использовали стандарт — профазные (4C) ядра клеток апикальной меристемы корня *Vigna radiata* сорта Berken с известным количеством ДНК (4C = 2.1 пг), а

также данные о количестве ДНК в диплоидных ядрах клеток *A. thaliana* ($2C = 0.32 - 0.4$ пг), представленные в базе данных Kew Botanical garden (<http://data.kew.org/cvalues>).

Для каждого варианта генотипа были проанализированы 100–200 ядер случайным образом выбранные с 2–3х постоянных препаратов. Математический анализ полученных результатов проводили с использованием алгоритма, предложенного А. В. Носовым с соавт. (Nosov *et al.*, 1983).

2.4. Выявление клеток, находящихся в S-фазе митотического цикла

Выявление клеток, находящихся в S-фазе митотического цикла, проводили по модифицированной методике Kotogány с соавт. (Kotogány *et al.*, 2010) с использованием аналога тимидина — 5-этинил-2'-дезоксинуридина (EdU).

Для инкубации с EdU отбирали аликвоты суспензионных культур клеток *Arabidopsis* и добавляли 10–20 мкМ EdU (“Invitrogen”, кат. № A10044) из 10 мМ раствора в диметилсульфоксиде (ДМСО). Клетки инкубировали при 26°C на орбитальном шейкере (120 качаний/мин) в течение 60–90 мин. Так как инкубацию с EdU проводили непродолжительное время, то его включение в синтезирующуюся ДНК останавливали добавлением 200 мкМ тимидина (дТ, “Sigma-Aldrich”, кат. T9250) в виде водного 10 мМ раствора. Клетки выдерживали с дТ 5 мин и либо фиксировали, либо выделяли из них протопласты. В качестве фиксатора для клеток *Arabidopsis* применяли 4% формалин (использовали забуференный 10% раствор “Sigma-Aldrich”, кат. №HT50-1-1) в PBS (2.7 мМ KCl, 1.47 мМ KH_2PO_4 , 137 мМ NaCl, 8 мМ Na_2HPO_4 , pH 7.4) с 0.1% Triton X-100.

Выделение протопластов проводили согласно методике, описанной выше (см. п. 2.2). Суспензию протопластов пропускали через нейлоновую сетку с ячейками 40 мкм и переносили в 10-миллилитровые пластиковые пробирки. Протопласты осаждали центрифугированием при $100\times g$ в течение 5 мин в бакет-роторе при комнатной температуре, осадок протопластов ресуспендировали в

10 мл 0.5 М сорбита с 2.5 мМ CaCl₂ (Сорб-Са) выдерживали 5 мин и центрифугировали (100×g, 5 мин), отмывку повторяли, к осадку добавляли Сорб-Са до 1.5 мл, суспензию по каплям добавляли к 3.5 мл холодного (4°C) метанола в 5-миллилитровые пробирки и выдерживали не менее 20–30 мин.

Включение EdU выявляли при помощи клик-реакции азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемой Cu(I) с азидом Alexa Fluor 488 (Rostovtsev *et al.*, 2002; Salic, Mitchison, 2008; Kotogány *et al.*, 2010) с модификациями, которые значительно улучшили воспроизводимость метода (Носов *et al.*, 2014). Фиксированные в метаноле протопласты два раза отмывали в 0.5 М сорбите без кальция, центрифугируя по 7–10 мин при 100×g, затем промывали в PBS с 0.1% Triton X-100 и PBS, к осадку (20–30 мкл) добавляли 150 мкл реакционной смеси для клик-реакции, а именно: PBS (до необходимого финального объёма) + 2 мМ CuSO₄ + 5 мкМ азида Alexa Fluor 488 (“Invitrogen”, кат. № A10266) из 1 мМ stock-раствора в ДМСО + 100 мМ аскорбата натрия (“Sigma-Aldrich”, кат. № A7631) из 0.5 М свежеприготовленного раствора. Спустя 30 мин протопласты центрифугировали, промывали 200 мкл PBS с 2 мМ азидом натрия, затем PBS. 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). Изображения обрабатывали в программе AxioVision 4.8 (Рис. 13). 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%.

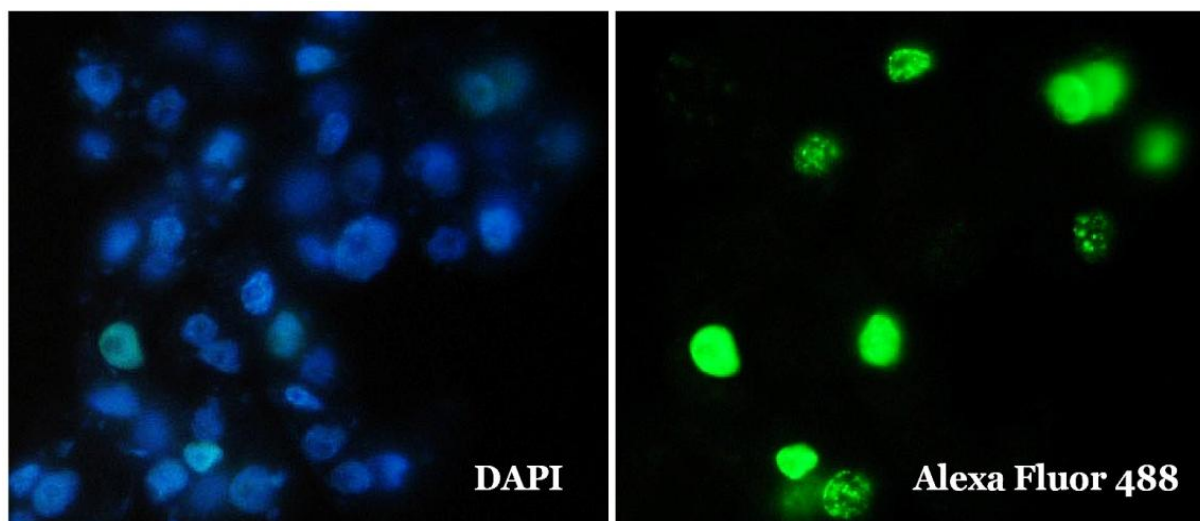


Рис. 13. Включение EdU в реплицирующуюся ДНК.

2.5. Проточная цитометрия

Помимо планарной цитофотометрии, для анализа распределения ядер по количеству ДНК использовали протопласты окрашенные пропидиум иодидом 10 мкг/мл (PI, “Fluka”, кат. № 81845) и проточный цитометр Guava easyCyte 6HT (“Merck Millipore”, Германия) с капилляром внутреннего диаметра 100 мкм, возбуждающим аргонным лазером 488 нм, детектором 680/30 нм и программным обеспечением InCyte. Перед окраской PI протопласты промывали PBS, к осадку добавляли 0.5 мл раствора РНКазы (в тёплый PBS (37°C) с 2.5 мМ ЭДТА-Na вносили необходимое количество, свободного от ДНКазы сток-раствора РНКазы А (“Sigma-Aldrich”, кат. № R5500) до конечной концентрации 100 мкг/мл) и затем инкубировали 1 ч при 37°C. После РНКазной обработки протопласты промывали PBS и окрашивали.

2.6. Получение этилена, определение содержания этилена, двуокиси углерода и кислорода

Получение этилена, определение содержания этилена, двуокиси углерода и кислорода проводили согласно методам, описанным ранее (Ракитин, Ракитин, 1986).

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 углеводородов (Ракитин, Ракитин, 1986) проводили в колонке (80–100 меш, 70 × 4 мм) Porapak N (“Supelco”, 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.

1-метилциклопропен (1-МСП) получали по методу Sisler и Serek (Sisler, Serek, 1997) в реакции фениллития (“Sigma-Aldrich”, кат. № 221023) с 3-хлор-2-метилпропеном (“Sigma-Aldrich”, кат. № 64230). Концентрацию 1-МСП определяли в газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором, сравнивая площадь пика 1-МСП и известного количества бутана. Хроматографический анализ проводили в колонке Porapak N (80–100 меш, 3 м × 2 мм) при температуре 120°C и расходе газа-носителя гелия 60 мл/мин.

2.7. Оценка скорости образования этилена

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 O₂ и CO₂, 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 которых (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.

2.8. Культивирование клеток с экзогенным этиленом и 1-МСП

Культивирование клеток *A. thaliana* с экзогенным этиленом и/или ингибитором его связывания с рецепторами — 1-МСП. При экспозиции клеток с газами более двух суток суспензию выращивали в 100-миллилитровых колбах Эрленмейера с 25 мл среды SH. Колбы закрывали одним слоем стерильной плотной хроматографической бумаги, помещали на столик из органического стекла, закрывали 20-литровым газовым колоколом и герметизировали (Рис. 14).



Рис. 14. Газовый колокол для культивирования суспензионной культуры *A. thaliana* в атмосфере экзогенных газов.

Через тубинг, присоединенный к выходящему из столика штуцеру, в колокола вводили следующие газы: 1-МСП (100 нл/л); этилен (20 мкл/л или 100 мкл/л); смесь 1-МСП (100 нл/л) с этиленом (20 мкл/л). Контрольный колокол содержал воздух. Всю конструкцию помещали на орбитальный шейкер (26°C, темнота, 100 качаний/мин). Проветривание и замену газов (1-МСП и этилена) проводили каждые четверо суток культивирования.

В экспериментах с предобработкой гетеротрофной культуры клеток этиленом перед их инокуляцией в свежую среду 10-дневную суспензию в 100-миллилитровых стаканах помещали в контейнеры (Рис. 15) рядом с широким кристаллизатором, содержащим 50 мл среды SH с 20 мкМ EdU.



Рис. 15. Контейнер для культивирования суспензионной культуры *A. thaliana* в атмосфере экзогенных газов.

Контейнер закрывали и вводили этилен (100 мкл/л). Через 5 ч контейнер открывали, быстро переносили 1 мл 10-дневной суспензии в кристаллизатор со средой, закрывали и снова вводили этилен. Контейнер помещали на орбитальный шейкер на 3 ч (26°C, темнота, 120 качаний/мин). 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.

2.9. Культивирование клеток в условиях гипоксии

Условия гипоксии обеспечивали культивированием клеток в течение двух суток в стерильных сосудах, закрытых стерильной фильтровальной бумагой, помещённых в герметично закрытые пластиковые контейнеры (Рис. 15), газовую фазу которых заменяли на смесь газов, содержащую 5% кислорода и 95% азота.

Альтернативно, клетки в течение двух суток инкубировали в герметично закрытых сосудах, газовую фазу которых заменяли на смесь газов, содержащую 5% кислорода и 95% азота. В конце вторых суток, сосуды открывали, продували

потоком стерильного воздуха, стерильно закрывали фольгой, после чего выдерживали ещё в течение суток в обычных условиях культивирования.

2.10. Исследование влияния 2,4-Д на синтез этилена отделёнными листьями *Arabidopsis thaliana*

Для каждого варианта эксперимента взвешивали по 10 листьев, затем их инкубировали в чашках Петри в течение часа в среде SH с добавлением 0.05% Tween-20, 10 мМ MES (pH 5.7), 2,4-Д (в концентрациях 0, 1, 5, 25 мкМ) из расчёта 10 мл / 100 мг. По 5 листьев из каждого варианта, брали для измерения продукции этилена сразу после инкубации, предварительно удалив с них среду фильтровальной бумагой. Оставшиеся листья помещали в чашки Петри с влажной фильтровальной бумагой на 24 часа, по прошествии которых повторяли измерения.

2.11. Выделение белков из культивируемых клеток и растений

Замороженные в жидком азоте культивируемые клетки или листья растений *Arabidopsis* гомогенизировали в ступке в жидком азоте. Белки экстрагировали в течение 30 минут на льду в буфере, который содержал 50 мМ Трис-HCl (pH 8), 10 мМ MgCl₂, 2 мМ ЭДТА, 250 мМ сахарозы, 1 мМ бензамидина, 1 мМ ДТТ, 50 мМ β-глицерофосфата, 2 мМ Na₃VO₄, 10 мМ NaF, 1 мМ ЭГТА, 1 мМ ФМСФ. Полученный экстракт центрифугировали 30 минут при 16 000×g, при 4°C. Супернатант переводили в 10 мМ Трис-HCl буфер (pH 7.6) гель-фильтрацией. Для этого в работе использовали колонки NAP-5 (“GE Healthcare”), заполненные Сефадекс G-25 Medium. Количество белка определяли при помощи бицинхонинового реагента (Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination) (Sigma) согласно протоколу производителя. В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин.

2.12. Электрофорез белков в денатурирующих условиях

Электрофорез в денатурирующих условиях (ДДС-Na-ПААГ) проводили в 12.5 или 15% гелях по (Laemmli, 1970). Препараты белков цитозоля, полученные как в разделах **2.11** и **2.13** или без обессоливания на Сефадексе, разбавляли до одной концентрации, смешивали с трехкратным буфером для образцов, содержащим 125 мМ Трис-HCl (pH 6.8), 20% глицерин, 4.6% ДДС-Na, 10% β -меркаптоэтанол, и кипятили в течение 5 мин. Электрофорез проводили в аппарате Mini-PROTEAN 3 (“Bio-Rad”) в течение 45 мин при 200 В. Для определения молекулярной массы полипептидов использовали маркеры Broad Range Protein Molecular Weight Markers (“Promega”). По окончании электрофореза гели фиксировали и окрашивали горячим способом в 0.25% Кумасси R250 в 25% этаноле и 25% уксусной кислоте. Фон отмывали 10% этанолом и 10% уксусной кислотой. Для определения молекулярных масс полипептидов в одномерном электрофорезе использовали программу One-Dscan V1.3 (“Scanalytics”, США). Вырезанные из гелей полипептиды идентифицировали при помощи MALDI-TOF MS в центре «Постгеномных и нанотехнологических инноваций» ГУ НИИ физико-химической медицины ФМБА.

2.13. Определение активности ферментов глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы

Замороженные в жидком азоте клетки гомогенизировали в ступке в жидком азоте. Белки экстрагировали в течение 30 минут на льду в буфере (соотношение массы клеток к буферу — 1г/2мл) следующего состава: 50 мМ глицин-фосфатный буфер, pH 9.0; 1 мМ ЭДТА; 4 мМ цистеин; 1 мМ фенилметилсульфонил фторид; 2 мМ Тетрамизол гидрохлорид; 10 мМ дитиоэритритол. Затем гомогенат центрифугировали при 16 000×g, 20 мин при 4°C. Проводили замену буфера и удаление низкомолекулярных соединений на колонках PD-10, заполненных Сефадекс G-25 Medium. (Merck), используя для элюции — 20 мМ глицин-

фосфатный буфер, рН 9.0 + 1 мМ ЭДТА. Концентрацию белка определяли при помощи бичинхонинового реагента (BCA Kit, Merck) согласно протоколу производителя. В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин. Реакционная смесь для определения активности глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы: 50 мМ глицин-фосфатный буфер рН 9.0; 1 мМ ЭДТА; 10 мкг белка; 1 мМ НАД; 1 мМ глицеральдегид-3-фосфата (G-3-P, Sigma G5376). Реакционная смесь для определения активности алкогольдегидрогеназы была аналогичной, но вместо G-3-P добавляли 50 мМ этанола. Реакцию проводили при 25°C. Активность определяли по накоплению НАД•Н (340 нм) на линейном участке кинетической кривой (первые 10–15 с) с помощью спектрофотометра UV-2700 (Shimadzu), используя молярный коэффициент экстинкции для НАД•Н при 340 нм: $\varepsilon = 6230 \times 10^{-6} \text{ л} \times \text{мкмоль}^{-1} \times \text{см}^{-1}$.

2.14. Вестерн блоттинг GAPC2

После электрофоретического разделения белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (45 мкм, Hybond-C Extra) в системе быстрого блоттинга Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) 30 мин в предустановленном режиме STANDARD SD, позволяющем одинаково эффективно переносить белки в широком диапазоне молекулярных масс при постоянном напряжении 25 В и силе тока до 1 А. По завершении переноса мембрану блокировали в буфере 10 мМ Трис-НСl рН 7.6; 0.05% Твин 20; 150 мМ NaCl; 1% желатин из кожи холодноводных рыб (Sigma) в течение 2 ч. После этого мембраны инкубировали с кроличьими антителами против белка GAPC2 (вторая изоформа глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы цитозольной локализации, Agrisera) в разведении 1:1000 в течение 18 ч при 4°C при постоянном покачивании. После интенсивной отмывки мембрану инкубировали 1.5 ч при 25°C с антителами против иммуноглобулинов кролика, мечеными пероксидазой хрена (разведение 1:10000). Визуализацию сигнала проводили с ECL Kit (Bio-Rad). Сигнал детектировали в системе ChemiDoc MP (Bio-Rad) в режиме Chemi Hi Sensitivity в течение 0.5–2 с. Полуколичественная

оценка содержания белка производилась по интенсивности сигнала с использованием программного обеспечения ImageLab.

2.15. Определение экспрессии *ERF1*, *CYCA2;3*, *CYCB1;1* и *GAPC2*

На разных этапах работы методом ПЦР после обратной транскрипции определяли уровни мРНК следующих генов: *ERF1* (*ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1*) — фактора транскрипции, который является специфичным индикатором ранних ответов на этилен, подтверждающий работу конечных регуляторных компонентов этиленового сигналинга (Lorenzo, 2003); *GAPC2* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2) — ген, кодирующий один из ключевых ферментов гликолиза, который участвует в редокс-сигналинге клеток растений — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу цитозольной локализации (Yang, Zhai, 2017); *CYCA2;3* и *CYCB1;1* — гены циклинов, экспрессия которых приурочена к G₂- и M-периодам КЦ соответственно (Komaki, Sugimoto, 2012). В качестве гена сравнения использовали *UBQ10* — один из пяти генов семейства полиубквитина. Нуклеотидные последовательности праймеров представлены в Табл. 1. ОТ-ПЦР включала следующие стандартные процедуры: РНК выделяли при помощи набора Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma). Качество образцов РНК оценивали электрофорезом в 1% агарозном геле, содержащем 1% формалина. Препараты РНК очищали от примеси ДНК при помощи ДНКазы I (Fermentas). Обратную транскрипцию проводили при помощи обратной транскриптазы SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). ПЦР проводили в 20 мкл буфера, содержащего 60 мМ Трис-НСl (рН 8,5), 25 мМ КСl, 1,5 мМ MgCl₂, 0,1% Тритон X-100, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 0,2 мМ дНТФ, 3 ед. акт. Таq-полимеразы HotTaq (Fermentas), по 2 пмоль каждого из праймеров (Табл. 1), 10–100 нг ДНК. Использовали Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems). По окончании ПЦР продукты реакции разделяли при помощи электрофореза в 1% агарозном геле.

Табл. 1. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных для ОТ-ПЦР.

Ген	ID гена	Нуклеотидная последовательность праймеров (5' → 3')	Размер праймера, нукл.	Размер ампликона, п.н.
<i>ERF1</i>	At3g23240.1	TTCAGTCCCCATTCTCCGGC (прямой)	20	249
		GCCGTCGTCTTACGCCTCTG (обратный)	20	
<i>GAPC2</i>	At1g13440	ATCGGAATCAACGGTTTCGG (прямой)	20	236
		GGGTTCCTGATGCCGAAAAC (обратный)	20	
<i>CYCA2;3</i>	At1g15570	AGGCACAGATAACACAGCTG (прямой)	20	359
		TGAGGTAGAGAGTGTCAGATGC (обратный)	22	
<i>CYCB1;1</i>	At4g37490	CGAGACGCCCCCACTACTTAGACTT (прямой)	25	722
		AGGCACAGATAACACAGCTG (прямой)	25	
<i>UBQ10</i>	At4g05320.2	AAACCСТАACGGGAAAGACG (прямой)	20	200
		CCTGAGAACAAGATGAAGGG (обратный)	20	

2.16. Обработка данных и представление результатов

Обработку данных проводили при помощи программ Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, США), SigmaPlot (SYSTAT Software Inc., США). На графиках представлены средние арифметические значения биологических повторностей и их стандартные отклонения.

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1. Интенсивность роста суспензионных культур клеток и продукция этилена

3.1.1. Этилен в газовой фазе колб с культивируемыми клетками

В 70-х и 80-х годах прошлого века авторы, исследовавшие влияния этилена на культуру тканей и клеток, наблюдали большое разнообразие в содержании этого газа в зависимости от вида культивируемых клеток и тканей и отмечали, что нередко более интенсивная продукция этилена была связана с периодами активного роста (Gamborg, Larue, 1971; Biddington, 1992; Moshkov *et al.*, 2008). Однако, опираясь на имеющиеся в литературе данные, выявить корреляцию между скоростью роста культивируемых клеток и продукцией этилена невозможно из-за отсутствия ростовых характеристик и особенностей методик определения выделения этилена.

В наших экспериментах все использованные штаммы суспензионных культур клеток в процессе субкультивирования выделяли этилен, который накапливался в газовой фазе колб (Табл. 2). Отметим, что содержание этилена было на 1–3 порядка выше, чем в воздухе (содержание этилена в воздухе — 5 нл/л.) и значительно варьировало для разных культур клеток.

Табл. 2. Содержание этилена в газовой фазе колб с суспензионными культурами клеток.

Суспензионная культура клеток	Содержание этилена, нл/л	Максимальная удельная скорость роста по сухому весу (μ_{\max} , сутки ⁻¹)
<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

3.1.2. Корреляция между удельной скоростью роста культур клеток и производством 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. Из результатов видно (Табл. 2), что самое большое содержание этилена было выявлено в газовой фазе суспензионных культур *A. thaliana*, которые характеризовались наибольшей интенсивностью роста. Тем не менее, важно понимать, что содержание этилена в газовой фазе также зависело от плотности закрывания колб, количества биомассы, объема среды и ее состава.

Поэтому более корректным будет рассматривать 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. 16).

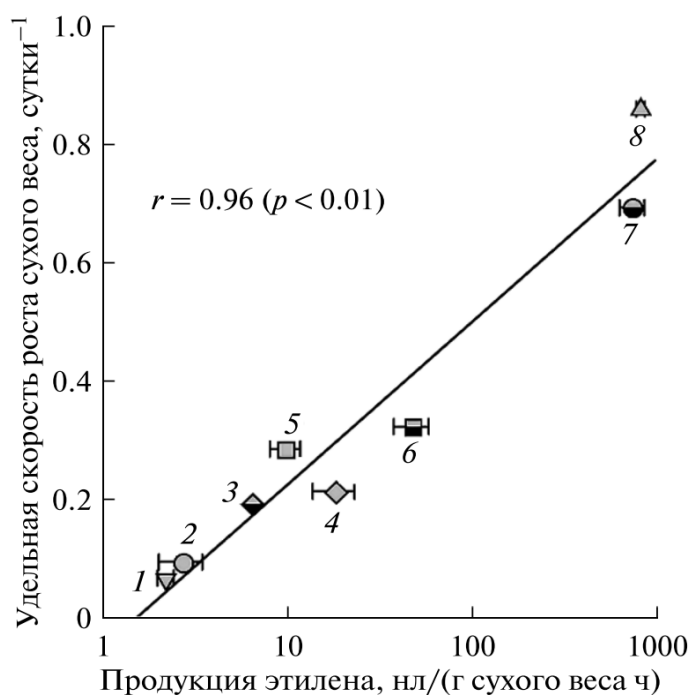


Рис. 16. Зависимость между удельной скоростью роста сухого веса и продукцией этилена для суспензионных культур клеток. 1 — *Panax ginseng*, 2 — *Euonymus maximoviczianus*, 3 — *Beta vulgaris*, 4 — *Medicago sativa*, 5 — *Triticum timopheevii*, 6 — *Ajuga turkestanica*, 7 — *Arabidopsis thaliana* (миксотрофный штамм), 8 — *A. thaliana* (гетеротрофный штамм). Абсцисса представлена в логарифмическом масштабе.

Однако выявленная зависимость не позволяет однозначно говорить о причинно-следственных отношениях между параметрами. Для более детального анализа была выбрана наиболее быстро растущая гетеротрофная суспензионная культура клеток *A. thaliana*. Кроме того были получены суспензионные культуры клеток из растений *A. thaliana*, имеющих мутацию в генах: одного из рецепторов этилена, ETR1 (мутант *etr1-1*); негативного регулятора этиленового сигналинга, Raf-подобной киназы, CTR1 (мутант *ctr1-1*); позитивного регулятора этиленового сигналинга, EIN2 (мутант *ein2-1*). Все суспензионные культуры мутантов *Arabidopsis* использовались в работе.

3.2 Влияние этилена на рост, цитофизиологию и пролиферацию суспензионных культур клеток *Arabidopsis thaliana*

3.2.1. Характеристика суспензионных культур клеток

Стабилизация параметров роста суспензионных культур клеток *A. thaliana*, используемых в нашей работе проходила первые 1.5 года культивирования: постепенно уменьшался размер клеточных агрегатов, увеличивалась скорость роста. После чего культуры клеток демонстрировали стабильные ростовые характеристики и цитоморфологию. Геном клеток мутантных линий сохранял точечную мутацию, что было показано методом аллельной ПЦР (Рис. 17) (Степанченко *с соавт.*, 2012).

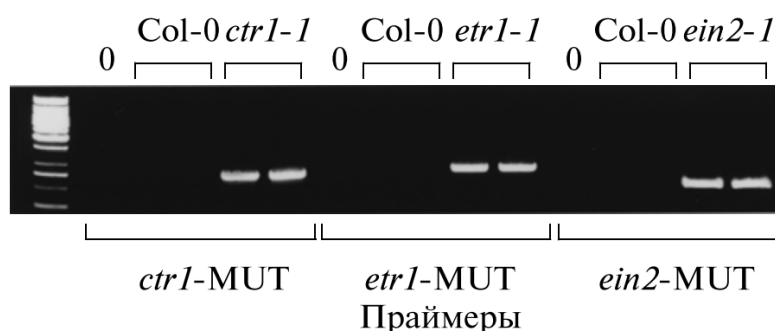


Рис. 17. Электрофореграммы продуктов ПЦР, полученных в присутствии аллель-специфических праймеров на ДНК клеток этилен-нечувствительных мутантов *ctr1-1*, *etr1-1* и *ein2-1* и на ДНК клеток Col-0. Слева — маркёры мол. массы. 0 — без матрицы ДНК.

Суспензии формировали небольшие агрегаты, как правило, из 10–50 клеток округлой и вытянутой формы, часто встречались клеточные файлы (Рис. 18). Мутант *ctr1-1* образовывал более крупные агрегаты с более крупными по своим размерам клетками. Важная особенность культур *etr1-1* и *ein2-1* — способность к образованию трахеальных элементов (ТЭ), которая сохранялась на протяжении всех лет культивирования *in vitro* (Рис. 18).

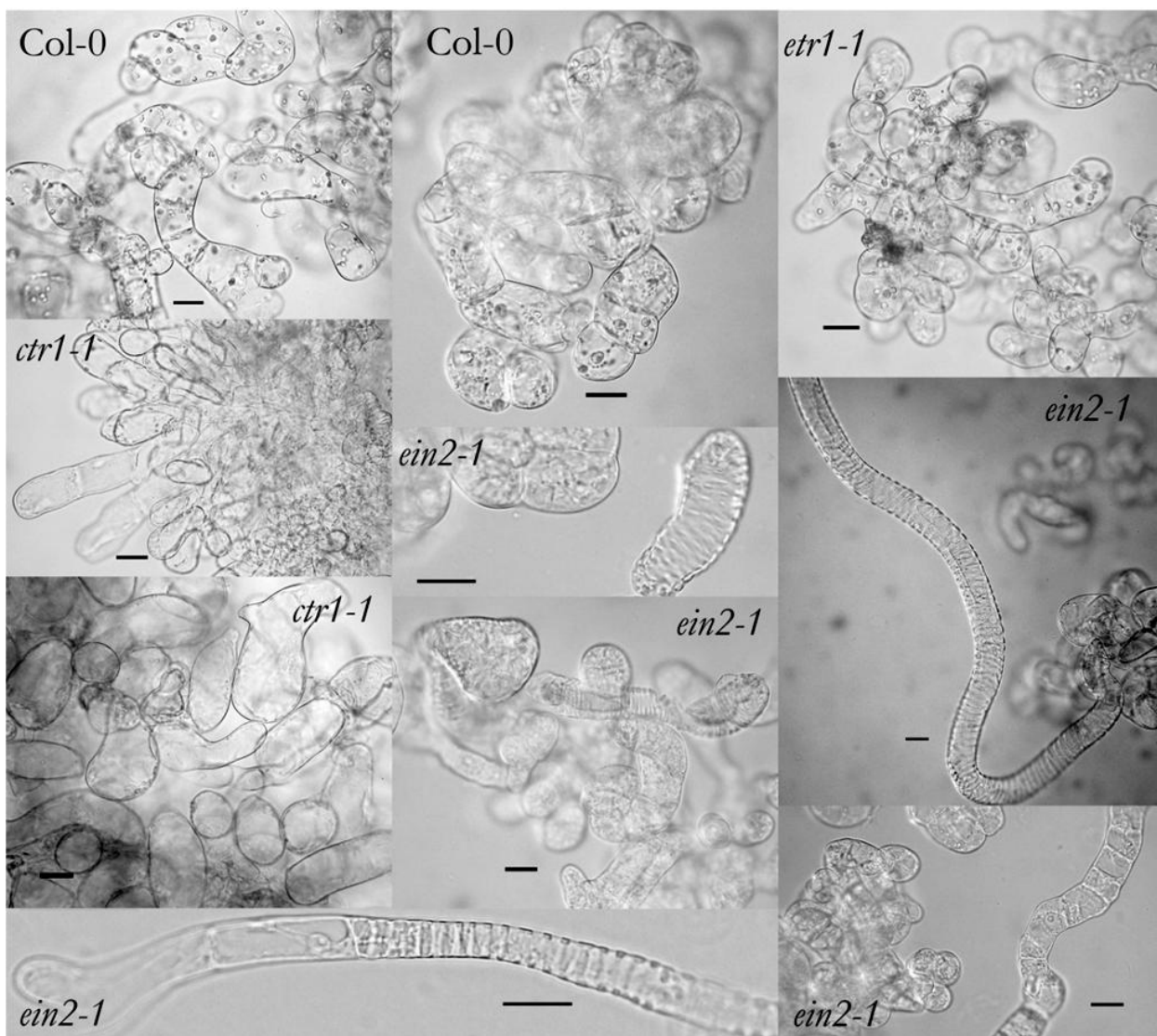


Рис. 18. Морфология клеток суспензионных культур *A. thaliana*. Размер линейки — 20 мкм.

Кривые роста имели форму, характерную для многих культивируемых клеток (Рис. 19). Популяция клеток Col-0 сразу после пересадки в свежую среду возобновляла рост и до пятого дня субкультивирования находилась в логарифмической фазе, которую сменяли фаза замедления и стационарная фаза роста. Таким образом, за десятидневный период субкультивирования суспензия клеток дикого типа завершает цикл роста, так же, как и суспензии *etr1-1* и *ein2-1*, а *ctr1-1* характеризуется наиболее медленным ростом.

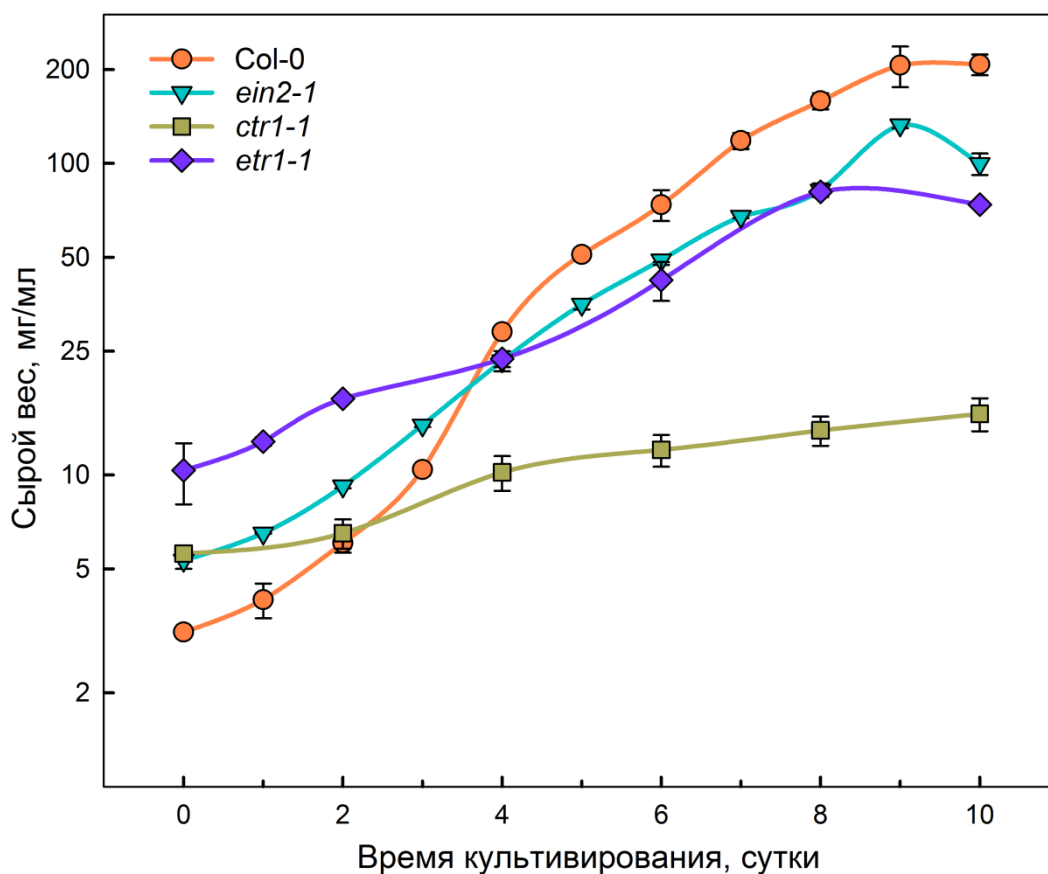


Рис. 19. Кривые роста суспензионных культур *A. thaliana*. Ордината представлена в логарифмическом масштабе.

3.2.2. Цитофотометрический анализ

Известно, что клетки практически всех тканей растений, в том числе и *A. thaliana*, миксоплоидны (Barow, Meister, 2003). Для культивируемых *in vitro* клеток миксоплоидия — также широко распространенное явление, которое может определяться как специфическими условиями культивирования (компоненты питательной среды, температура и др.), так и плоидностью исходного экспланта. В связи с этим было проанализировано влияние продолжительного культивирования, в том числе и этилена, продуцируемого клетками и, неизбежно, накапливающегося в культуральных сосудах, на распределение клеток по количеству ядерной ДНК.

Цитофотометрический анализ ядерной ДНК в клетках суспензионных культур Col-0, *etr1-1*, *ctr1-1* и *ein2-1* проводили через два года с момента их получения. Для первых трёх культур (полученных на три года раньше, чем *ein2-1*)

цитофотометрию проводили дополнительно спустя 6 лет с момента получения, а для суспензии клеток *ein2-1* применяли проточную цитометрию спустя 4 года её роста *in vitro* (Рис. 20).

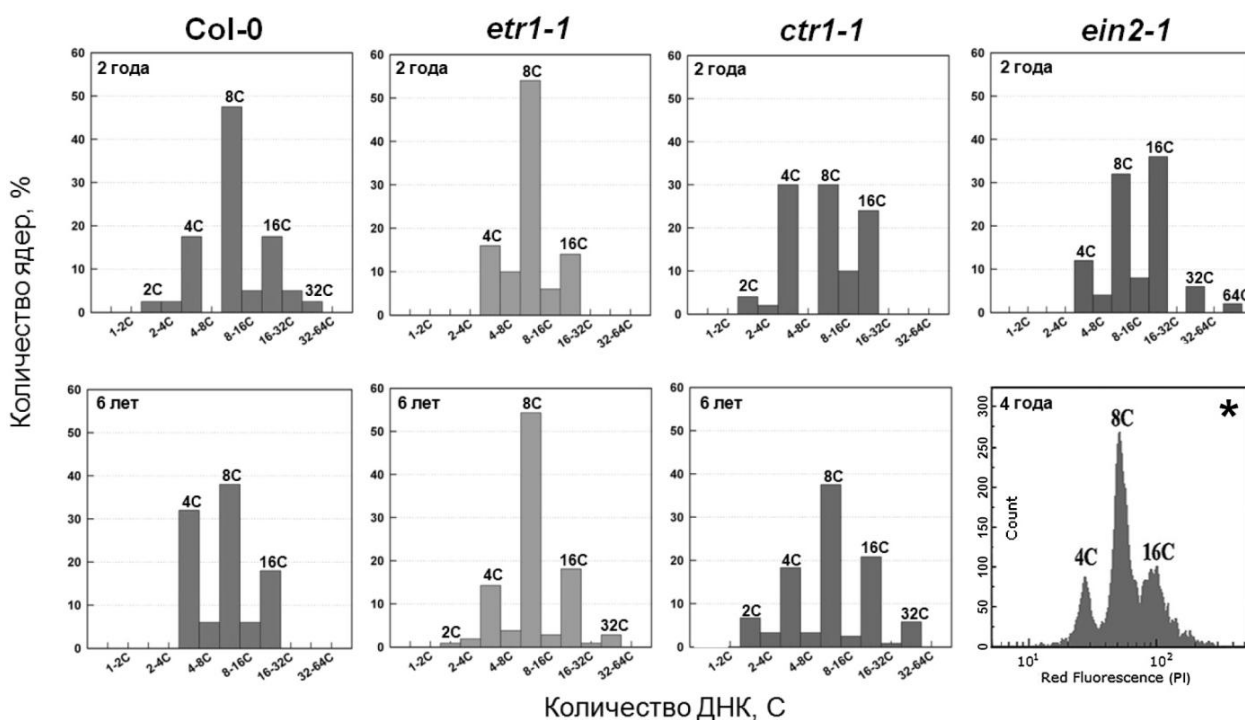


Рис. 20. Анализ количества ядерной ДНК в суспензионных культурах клеток *A. thaliana*. Для суспензии клеток *ein2-1* спустя 4 года культивирования использовали проточную цитометрию (*).

Представленные данные показывают (Рис. 20), что все изучаемые нами культуры были миксоплоидны. Количество ДНК в ядрах «молодой» суспензии дикого типа варьировало от 2С до 32С с преобладанием 8С. При последующем культивировании *in vitro* увеличилась доля ядер с 4С количеством ДНК и уменьшилась доля 8С ядер. Учитывая, что полученные данные представляют собой «моментальные срезы ситуации» в субкультивированиях, разделенных значительным интервалом времени, можно уверенно говорить о стабильности распределения ядер по количеству ДНК в клетках суспензии Col-0. Хорошо видно, клетки суспензионной культуры Col-0 со временем пошли по пути значительной

редукции крайних значений ploидности ядер и увеличения доли ядер с количеством ДНК 4С.

Распределение ядер по количеству ДНК в «молодой» культуре клеток *etr1-1* (Рис. 20) оказалось сходным с таковым в клетках Col-0, но спектр ploидности был более узким (от 4С до 16С), а количество октаploидных ядер было больше (54%). Шесть лет культивирования *in vitro* клеток *etr1-1* привело к незначительному расширению спектра ploидности, появилась небольшая доля ядер 32С. Однако клетки *etr1-1* имеют ярко выраженный модальный класс ядер с количеством ДНК 8С, что сохранялось при длительном культивировании (Фоменков *с соавт.*, 2014).

Для целых растений *ctr1-1* характерен более высокий уровень эндоредупликации во многих тканях (Yoshizumi *et al.*, 2006). Эта тенденция сохраняется и для клеток *in vitro*. Популяция клеток *ein2-1* спустя 4 года культивирования проявляет явную тенденцию к сужению спектра ploидности в сторону 8С. Таким образом, условия *in vitro* не оказали существенного влияния на спектр ploидности культур клеток *Arabidopsis thaliana*.

3.2.3. Соотношение пролиферативной активности и продукции этилена в суспензионной культуре клеток Col-0

Как уже было отмечено выше, культура клеток Col-0 производит много этилена в процессе культивирования. Сразу же после инокуляции клеток в свежую питательную среду, резко активировалась продукция этилена (Рис. 21, 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 циклу выращивания совпадали максимумы и общий ход кривых, отражающих динамику продукции этилена, доли S-фазных клеток и удельной скорости увеличения числа клеток (Рис. 21, кривые 1–3).

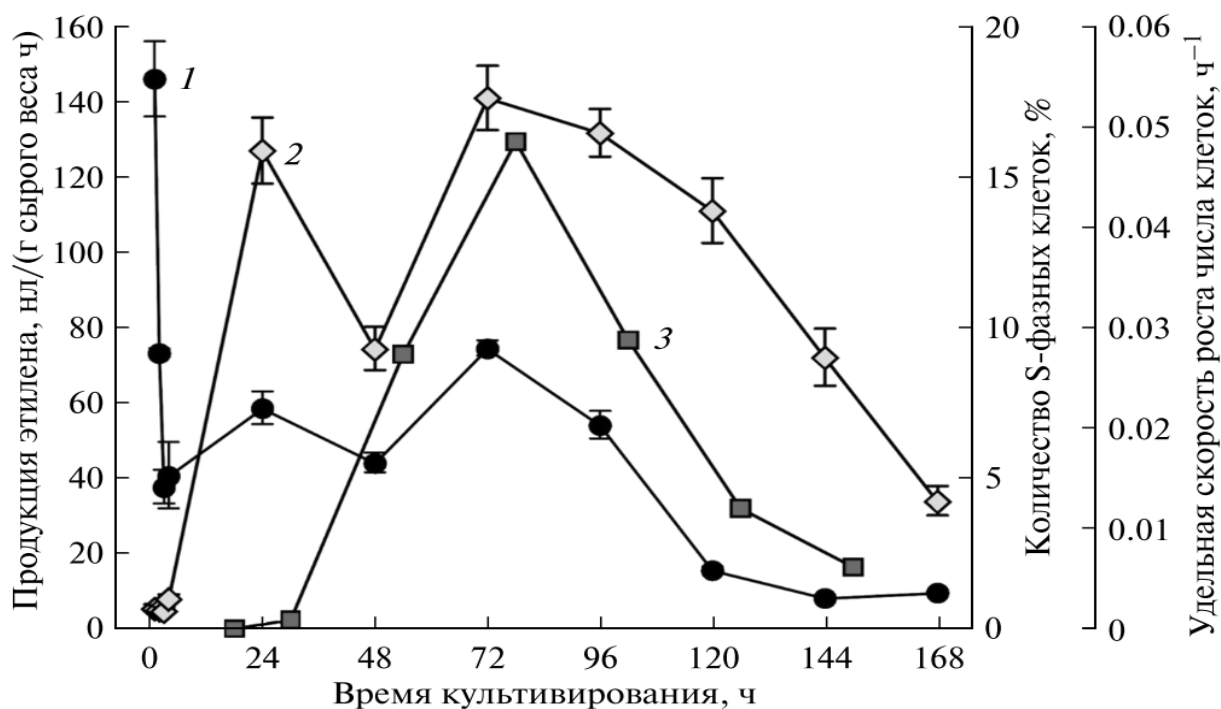


Рис. 21. Динамика продукции этилена (1), количества S-фазных клеток (2) и удельной скорости роста числа клеток (3) в цикле выращивания гетеротрофной суспензионной культуры клеток *A. thaliana*.

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. Так, хорошо 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 (Meir *et al.*, 1985). Факт совпадения первого пика S-фазных клеток с подъемом продукции этилена в точке 24 ч, может указывать на участие этилена в реализации событий частичной синхронизации КЦ в начале субкультивирования.

Исходя из максимальной удельной скорости увеличения числа клеток ($\mu_{\max} = 0.048 \text{ ч}^{-1}$), время их удвоения (T_d) равно 14.4 ч. Такая продолжительность T_d меньше продолжительности КЦ в меристеме корня *Arabidopsis* (16–18 ч) (Yin *et al.*,

2014; Филин, Иванов, 2016). Иными словами клетки себя чувствуют «комфортно» и большая концентрация этилена не тормозит КЦ. 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. В таком случае корреляция между выделением этилена и удельной скоростью роста числа клеток весьма высока (Рис. 22, а). Если значение μ вычислять для 12-часового отрезка времени, предвещающего точку определения продукции этилена, то подобной корреляции уже не наблюдается (Рис. 22, б). Это косвенно говорит о том, что синтез этилена предшествует пролиферации клеток (Фоменков *с соавт.*, 2015).

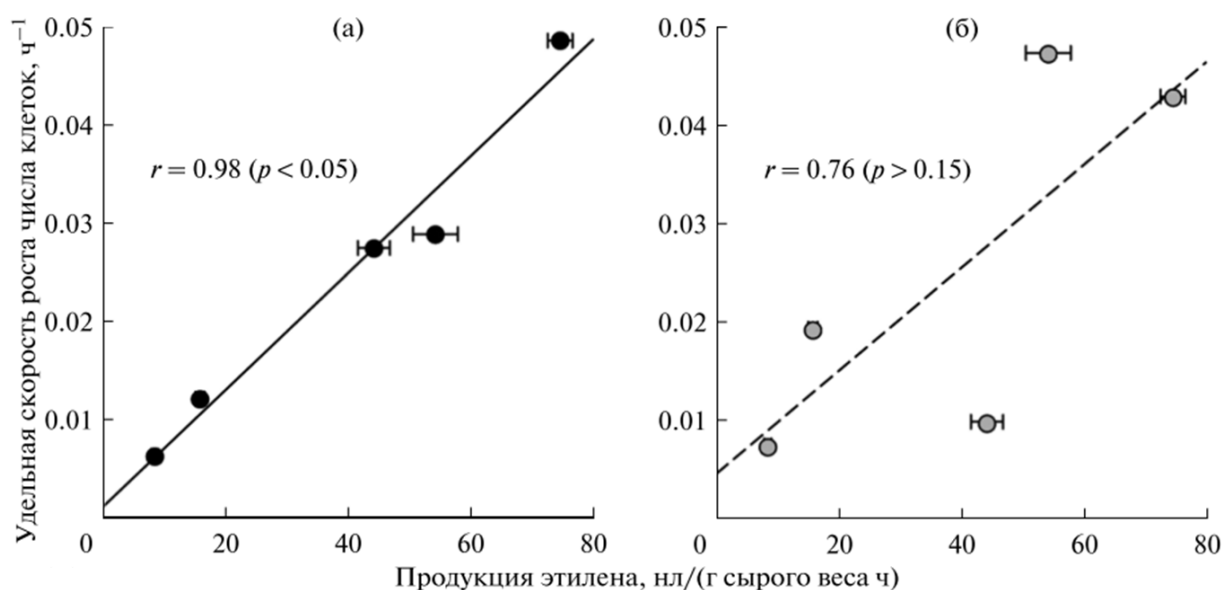


Рис. 22. Зависимость между удельной скоростью роста числа клеток и продукцией этилена в гетеротрофной суспензионной культуре клеток *A. thaliana*. (а) — удельная скорость роста числа клеток рассчитана для 12-часового интервала после точки определения продукции этилена; (б) — удельная скорость роста числа клеток рассчитана для 12-часового интервала, предвещающего точку определения продукции этилена.

3.2.4 Выбор концентраций экзогенного этилена и 1-МСП — ингибитора его связывания с рецепторами

В предварительных экспериментах было показано, что в используемых нами системах инкубации суспензионных культур в атмосфере экзогенного этилена (см. Рис. 14 и Рис. 15) концентрация этилена падает не более чем на 10–15% за всё время эксперимента, а культивируемые клетки сохраняют высокую жизнеспособность даже при очень высоких концентрациях этилена, превосходящих физиологические на 2–3 порядка (Рис. 23).

В исследованиях, касающихся роли этилена в каких-либо физиологических процессах растений, наряду с использованием этилен-нечувствительных мутантов часто применяют ингибиторы связывания этилена с его рецепторами. В нашей работе в качестве такого ингибитора выбран 1-МСП, поскольку известно, что 1-МСП в концентрации 50–100 нл/л блокирует эффекты этилена в концентрации до 20 мкл/л (Sisler, Serek, 1997). В данной работе использовали 1-МСП в концентрации 100 нл/л.

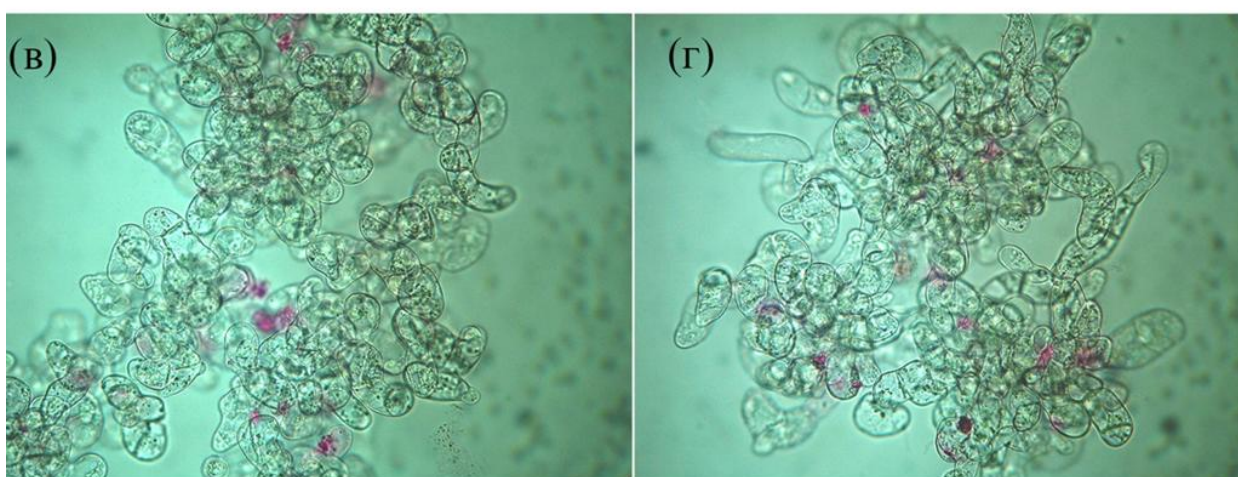
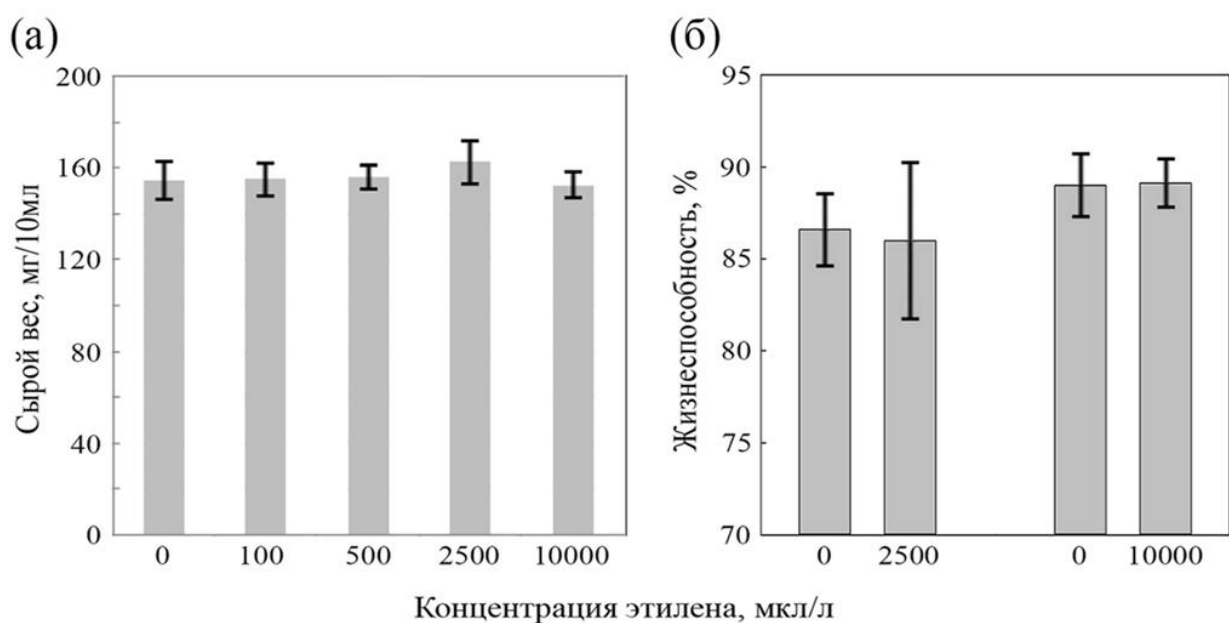


Рис. 23. Рост и жизнеспособность клеток Col-0 при инкубации в атмосфере экзогенного этилена: (а) — сырой вес суспензионной культуры клеток Col-0 через 96 часов инкубации в атмосфере с разной концентрацией экзогенного этилена; (б) — жизнеспособность клеток Col-0 после 96 часов действия 2500 мкл/л этилена и 72 часов действия 10 000 мкл/л этилена; (в) — микрофотография клеток суспензионной культуры Col-0 через 72 часов культивирования в нормальной атмосфере, и (г) — в присутствии 10000 мкл/л этилена (окрашивание 0.02% водным раствором Erythrosin B).

В предварительных экспериментах был определён состав газа в газовых колоколах объемом ~20 л после выращивания восьми колб со стандартным инокулятом в течение 3 суток. В колоколе с воздухом: O_2 — 18.5%; CO_2 — 1.75%; C_2H_4 — 1.39 ppm. В колоколе с 1-МСП: O_2 — 18.5%; CO_2 — 1.82%; C_2H_4 — 1.25 ppm. Очевидно, что этилен, выделяемый клетками, свободно выходил из колб

через хроматографическую бумагу в общий объем колокола. В связи с этим была выбрана концентрация этилена в 20 мкл/л, сходная с обычной его концентрацией в колбах, закрытых фольгой.

3.2.5. Влияние экзогенного этилена и 1-МСП на суспензионную культуру клеток Col-0

Как уже отмечалось, в начале цикла выращивания после всплеска продукции этилена в первый час культивирования наблюдали её быстрый спад (Рис. 24). При этом к 4 ч начинало увеличиваться количество S-фазных клеток. Причиной активации выделения этилена могут быть как физические манипуляции с клетками («пипетирование» при пересадке), 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 (Konze, Kwiatkowski, 1981).

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 в КЦ (Mehrnia *et al.*, 2013). Возможно, подобная цепь событий наблюдается и в случае инокуляции клеток в свежую среду.

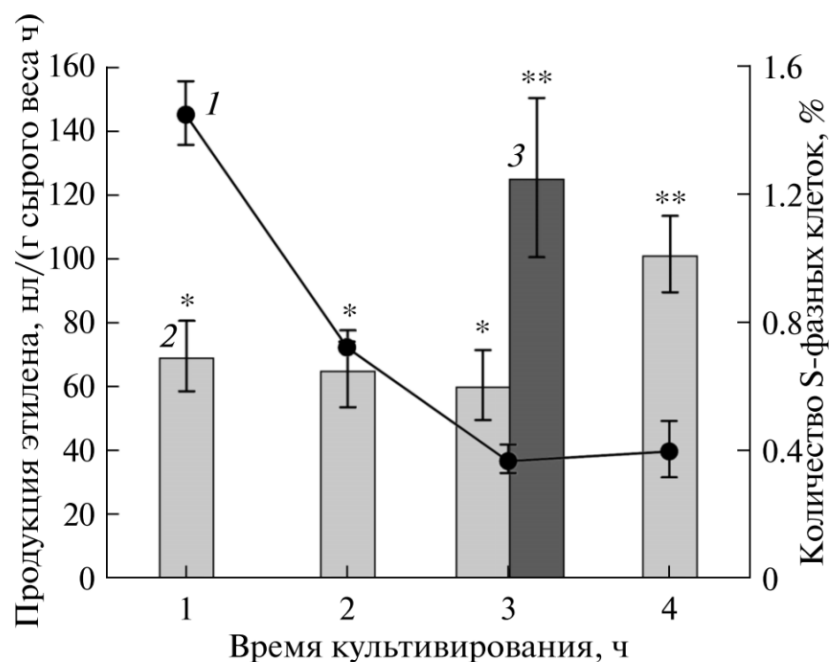


Рис. 24. Динамика продукции этилена и количества S-фазных клеток в первые часы после инокуляции клеток гетеротрофного штамма *A. thaliana* в свежую питательную среду. 1 — продукция этилена; 2 — количество S-фазных клеток в контрольном варианте (воздух); 3 — количество S-фазных клеток после предобработки 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 $p < 0.05$.

Если предположить, что 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 три часа количество S-фазных клеток было в два раза больше по сравнению с клетками, которые культивировали в воздухе (Рис. 24, колонка 3; Рис. 25, 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. 25, варианты 2, 3). Аналогичный результат получили при действии 100 мкл/л этилена с первых по третьи сутки (Рис. 25,

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. 25, вариант 5). Если культуру клеток подвергали действию этилена, начиная с пятых суток (Рис. 25, вариант 6), то на девятые сутки индекс S-фазных клеток значительно увеличивался.

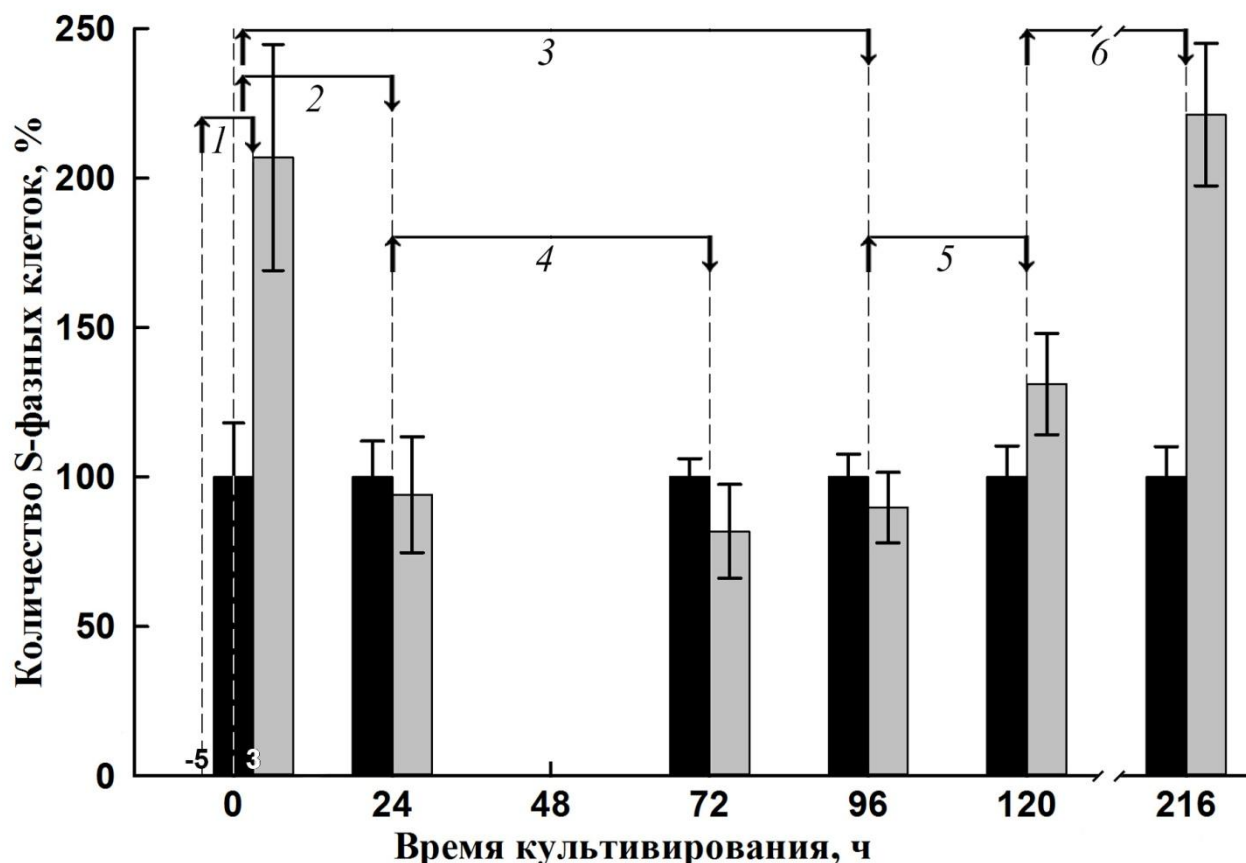


Рис. 25. Влияние экзогенного этилена на количество S-фазных клеток в зависимости от момента обработки этиленом гетеротрофной суспензионной культуры *A. thaliana* Col-0 в течение цикла выращивания. 1 — предобработка клеток за 5 ч до инокуляции, анализ через 3 ч после инокуляции; 2 — культивирование в 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.

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 закрывания 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. 21 и Рис. 25, то можно предположить, что экзогенный этилен эффективен тогда, когда продукция эндогенного этилена мала. Этилен, в отличие от 1-МСП, 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 (Рис. 26), а действие 1-МСП — к снижению (Фоменков *с соавт.*, 2014).

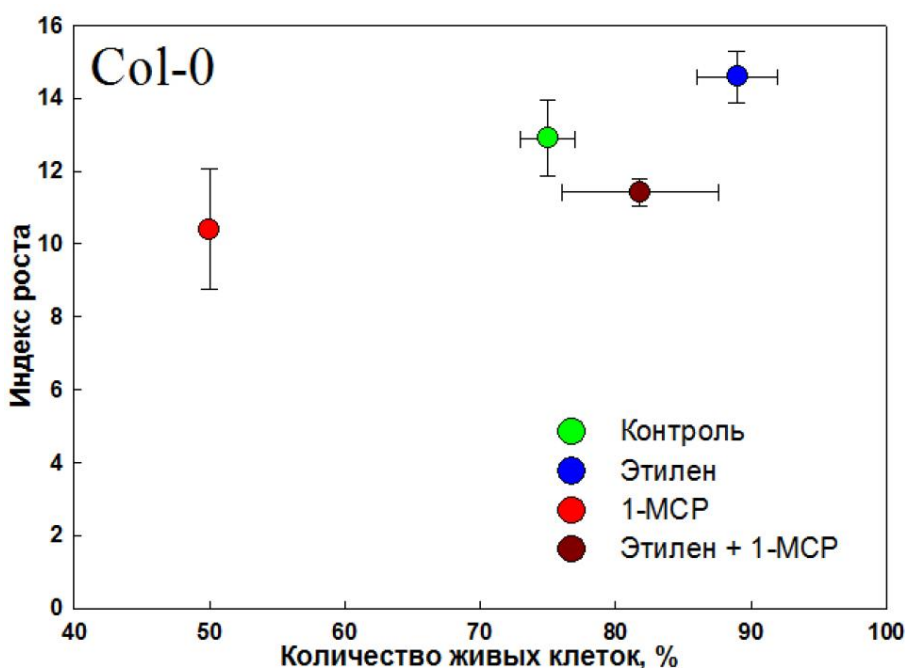


Рис. 26. Жизнеспособность и индексы роста культивируемых клеток *A. thaliana* Col-0 после культивирования в газовых колоколах, содержащих воздух, 20 мкл/л этилена, 100 нл/л 1-МСП, либо смесь 20 мкл/л этилена и 100 нл/л 1-МСП.

Отметим, что влияние 1-МСП — ингибитора связывания этилена с рецепторами на экспрессию митотических циклинов *CYCB1;1* и *CYCA2;3* (Рис. 27, в) подтверждает его негативное влияние на рост суспензии клеток Col-0.

Таким образом, можно говорить, что этилен является активным участником в регуляции пролиферации культивируемых клеток Col-0.

3.2.6. Влияние экзогенного этилена и 1-МСП на суспензионные культуры клеток *etr1-1* и *ctr1-1*

Жизнеспособность клеток *etr1-1* под действием 1-МСП значительно снижалась на четвертые сутки (Рис. 27, а). Этилен, в отличие от 1-МСП, повышал жизнеспособность культивируемых клеток мутанта *etr1-1*. Аналогичным образом и 1-МСП, и этилен влияли на индекс роста *etr1-1*, что подтверждает экспрессия митотических циклинов (Рис. 27, в). Смесь 1-МСП с этиленом по своему действию на рост и жизнеспособность культуры занимала промежуточное положение. На клетки мутанта *ctr1-1*, отличающегося значительно более медленным ростом, обработки не влияли сколько-нибудь значимым образом (Рис. 27, б).

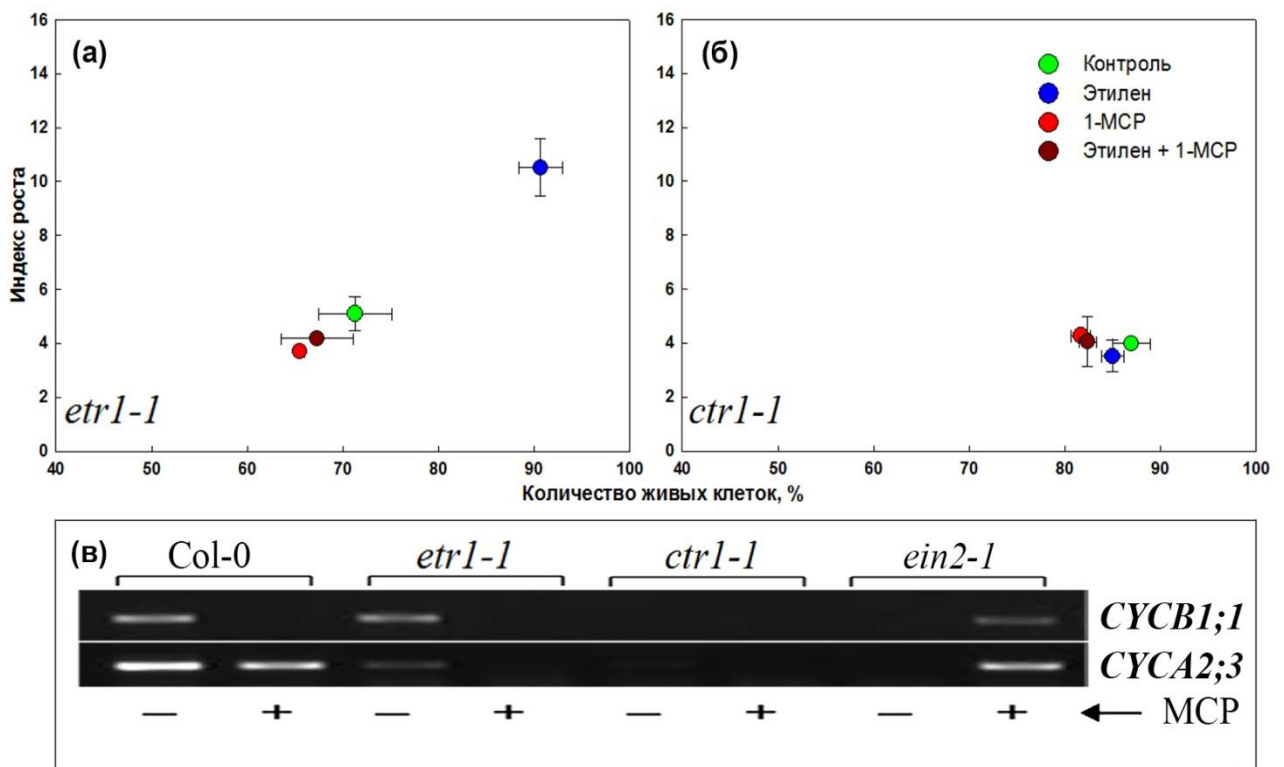


Рис. 27. Жизнеспособность и индексы роста культивируемых клеток *A. thaliana etr1-1* (а) и *ctr1-1* (б) после культивирования в газовых колоколах, содержащих воздух, 20 мкл/л этилена, 100 нл/л 1-МСП, либо смесь 20 мкл/л этилена и 100 нл/л 1-МСП. (в) Экспрессия генов *CYCB1;1* и *CYCA2;3* во всех использованных в работе штаммах суспензионных культур клеток *A. thaliana* после культивирования в газовых колоколах, содержащих воздух или 100 нл/л 1-МСП.

Увеличение жизнеспособности и роста при неработающем рецепторе ETR1 в присутствии повышенной концентрации этилена, может говорить о том, что за эти функции отвечают другие рецепторы.

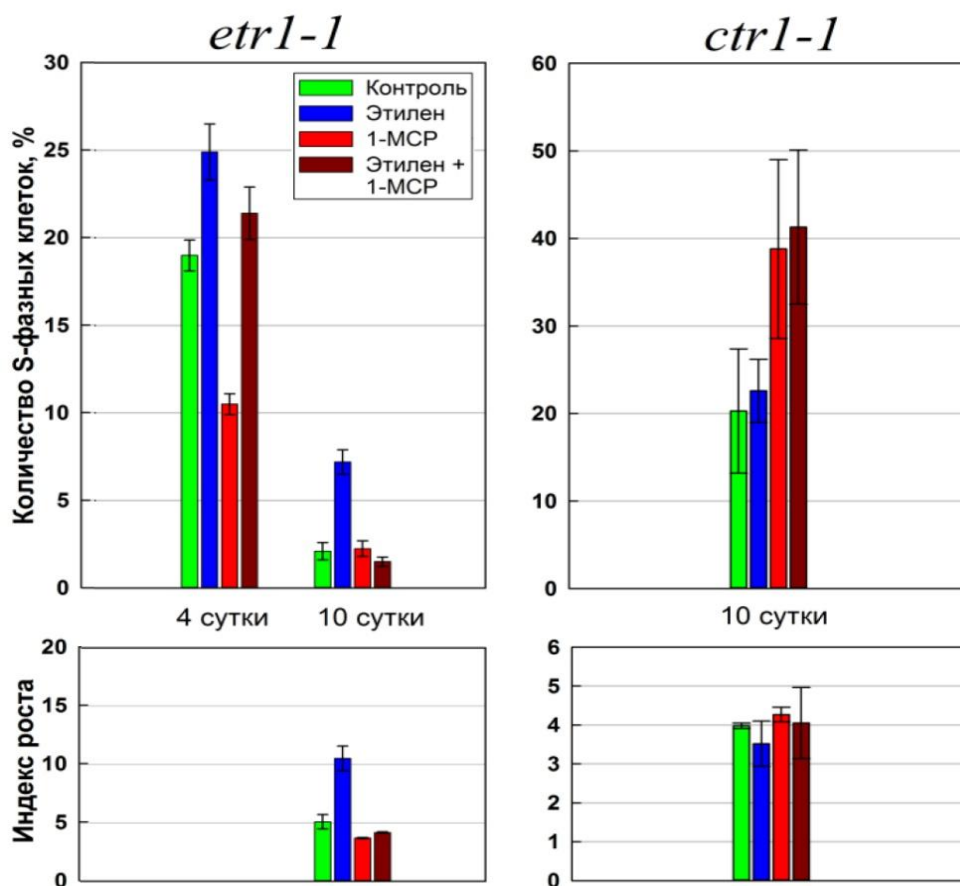


Рис. 28. Изменение количества S-фазных клеток и индексов роста культивируемых клеток *A. thaliana etr1-1* и *ctr1-1* на 4-е и 10-е сутки культивирования в газовых колоколах, содержащих воздух, 20 мкл/л этилена, 100 нл/л 1-МСП, либо смесь 20 мкл/л этилена и 100 нл/л 1-МСП.

В культуре клеток *etr1-1* этилен значительно увеличивал количество S-фазных клеток в начале пассажа. Аналогичная картина сохранялась и в конце пассажа (Рис. 28). Ингибитор связывания этилена с его рецепторами (1-МСП) действовал противоположным образом. Данные о количестве S-фазных клеток во всех экспериментальных вариантах хорошо соотносились с индексами роста культуры *etr1-1* (Рис. 28). Отдельно следует отметить, что, не смотря на то, что во всех экспериментальных условиях индекс роста *ctr1-1* достоверно не изменяется, но в присутствии МСП, хотя и с большой ошибкой, увеличивается количество S-фазных клеток (Рис. 28). Это может говорить о том, что существуют «альтернативные» пути передачи сигнала в обход CTR1.

Представленные в настоящей работе результаты показывают, что суспензионная культура клеток *etr1-1* способна в течение длительного времени сохранять рост и пролиферацию *in vitro*.

Популяция клеток *etr1-1* ощутимо отстает в показателях роста. Возможно, что в условиях суспензионной культуры клетки испытывают своего рода постоянное «затопление», важнейшие признаки которого — повышение концентрации этилена и гипоксия, являются триггерами этилен-зависимого растяжения клеток (Pierik *et al.*, 2006; Jackson, 2008; Polko *et al.*, 2011) которое, очевидно, в культивируемых клетках *etr1-1* функционирует неисправно, поскольку клетки *etr1-1* значительно мельче (см. Рис. 18). Тем не менее, клетки *etr1-1* отвечают на дополнительную этиленовую нагрузку и на блокирование связывания этилена с рецепторами с помощью 1-MCP. Ингибитор значительно снижает, а этилен повышает жизнеспособность клеток, индекс роста, количество S-фазных клеток. Это, еще раз подчеркнём, указывает, что за контроль пролиферации клеток скорее всего отвечает не ETR1, а другие рецепторы этилена, тем более, что в литературе активно обсуждается вопрос о том, что рецепторы этилена могут обладать индивидуальными неперекрывающимися свойствами, необходимыми для возникновения специфического ответа на фитогормон (Shakeel *et al.*, 2013).

Как уже было отмечено ранее, CTR1 является негативным регулятором сигнального пути. Это значит, что мутанты по гену, кодирующему этот белок, имеют постоянный конститутивно высокий уровень сигнала этилена. Фенотипически на растениях *Arabidopsis* это проявляется в значительном замедлении роста, укорочении стебля и листьев.

Представленные результаты показывают, что суспензионная культура клеток *ctr1-1*, также в значительной степени отличается от культуры дикого типа Col-0. Она значительно отстаёт по своим ростовым показателям (Рис. 19), которые, при этом, практически не реагируют на обработки экзогенным этиленом или ингибитором его связывания с рецепторами (Рис. 27). Однако обращает на себя внимание тот факт, что мы наблюдали определённое увеличение количества

S-фазных клеток (Рис. 28) в тех вариантах обработки экзогенными газами, в которых присутствовал 1-МСП. Вероятно, это может говорить о существовании обходного пути передачи сигнала этилена, который у *ctr1-1* обычно «маскируется» конститутивно высоким уровнем «канонического» пути.

3.2.7. Влияние экзогенного этилена и 1-МСП на суспензионную культуру клеток *ein2-1*

В проведении сигнала этилена его рецепторы и белок CTR1 играют роль негативных регуляторов, и при действии этилена они перестают работать на элиминацию EIN2, путём его фосфорилирования с последующим протеолизом. Но в случае нефункциональности позитивного регулятора EIN2 (например, в результате мутаций, таких как *ein2-1*) сигнал этилена пройти дальше не может, как следует из канонического пути проведения сигнала этилена (см. Рис. 11).

Суспензионная культура клеток *ein2-1* получена в 2009 г. и прекрасно растёт. На графиках (Рис. 29) видно, что максимум количества S-фазных клеток совпадает с логарифмической фазой роста обеих культур. При этом у культуры Col-0 S-фазный индекс имеет два пика, которые совпадают с интенсивностью выделения этилена. В культуре *ein2-1* присутствует лишь один пик и выделение этилена ему соответствует. Особо на себя обращает тот факт, что при незначительной разнице в скорости роста этих двух культур (Рис. 19, Рис. 29) интенсивность выделения этилена отличается примерно в 40 раз.

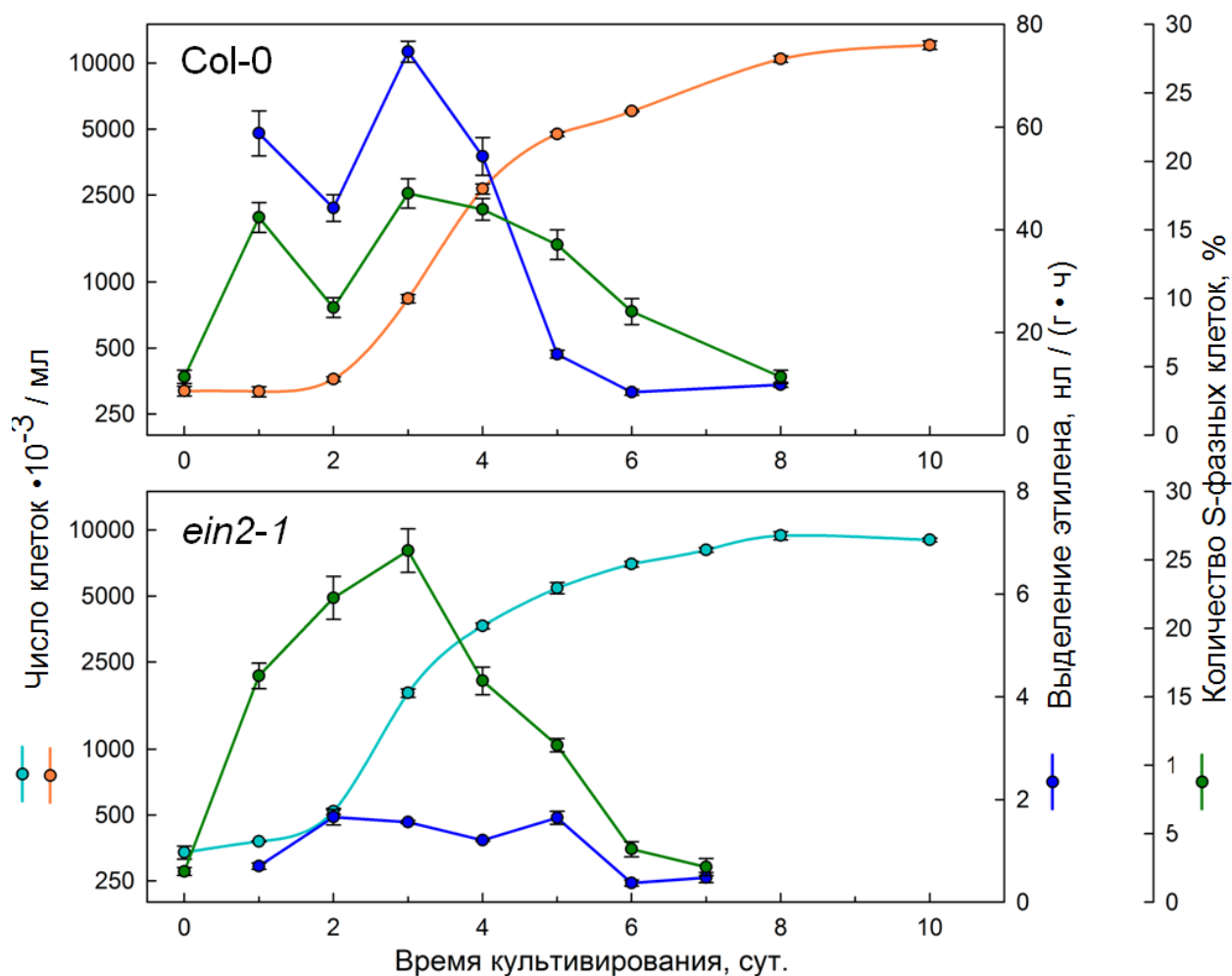


Рис. 29. Динамика продукции этилена, количества S-фазных клеток и роста числа клеток в цикле выращивания гетеротрофной суспензионной культуры клеток *A. thaliana* дикого типа Col-0 и мутанта *ein2-1*.

Поскольку известно, что ауксины активируют синтез этилена, то встал вопрос о том, не связана ли эта разница с нарушением восприятия ауксина. Чтобы это проверить, были использованы листья 4-х недельных растений *A. thaliana*, помещённые на час в питательную среду SH, содержащую заданные концентрации 2,4-Д, после чего их в течение 24-х часов выдерживали на влажной фильтровальной бумаге в закрытых чашках Петри. Измерение продукции этилена проводили сразу после обработки и спустя 24 часа.

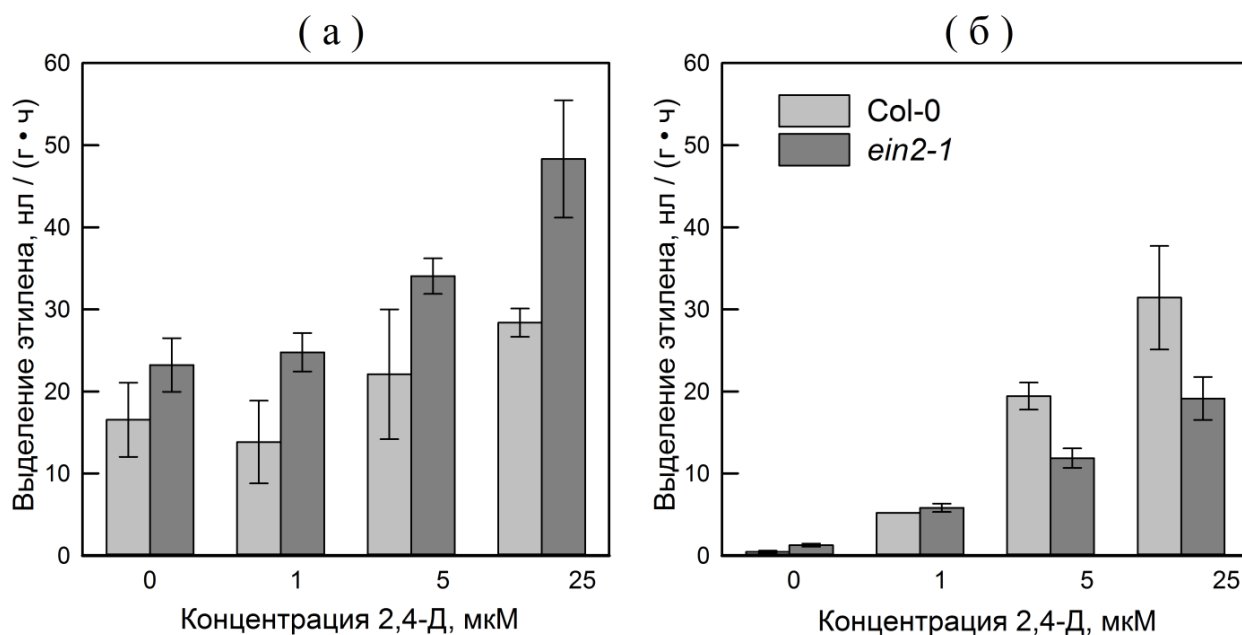


Рис. 30. Выделение этилена листьями растений Col-0 и *ein2-1* под влиянием 2,4-Д. (а) — в первые часы после отделения листьев от растения и обработки 2,4-Д; (б) — спустя 24 часа после обработки 2,4-Д.

В первые часы после отделения листьев от растения во всех вариантах, как с обработкой 2,4-Д, так и в контроле без неё, наблюдалось резкое увеличение выделения этилена — «раневой эффект» (Рис. 30, а). Однако уже здесь видна концентрационная зависимость выделения этилена. Для того, чтобы избавиться от влияния всплеска выделения этилена в ответ на механическое повреждение, измерения повторили спустя 24 часа. Как видно из графика (Рис. 30, б), 2,4-Д практически в одинаковой степени стимулировал выделение этилена отделёнными листьями обоих генотипов, что говорит о нормальном восприятии сигнала ауксинов и наличии ауксин-стимулированного синтеза этилена как у растений дикого типа, так и у мутанта.

Из литературы известно, что имеется «crosstalk» между этиленовым и жасмонатным путями передачи сигнала. В частности, показано, что при обработке растений *ein2-1* ингибитором синтеза жасмоната им можно вернуть чувствительность к этилену, что объясняют наличием альтернативного пути передачи сигнала этилена без участия EIN2 (Kim *et al.*, 2013). При обработке

культивируемых клеток метилжасмонатом мы наблюдали следующий ответ (Рис. 31).

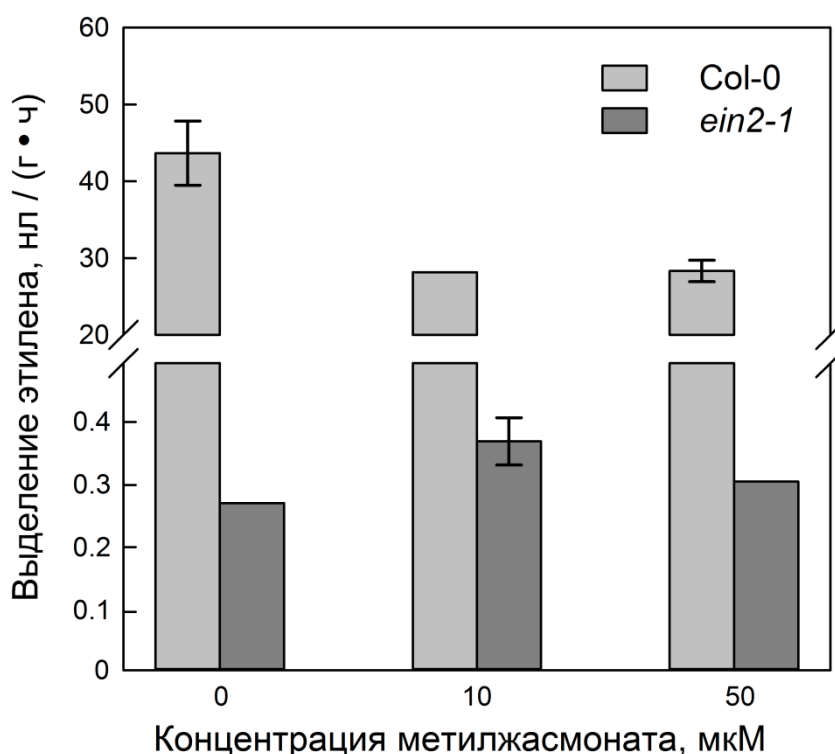


Рис. 31. Выделение этилена суспензионными культурами Col-0 и *ein2-1* при обработке метилжасмонатом.

Выделение этилена клетками Col-0 снижалось, а клетками *ein2-1* хотя и незначительно, но повышалось, такая реакция на метилжасмонат может говорить об отсутствии конститутивно высокого уровня жасмонатов и наличии функционирующего альтернативного пути передачи сигнала этилена в обход EIN2.

Рассмотрим теперь влияние экзогенного этилена и ингибитора его связывания с рецепторами — 1-MCP на культуру клеток *ein2-1*.

В культуре клеток *ein2-1* действие этилена и MCP и смеси этих газов на жизнеспособность клеток и прирост биомассы было сходным (Рис. 32).

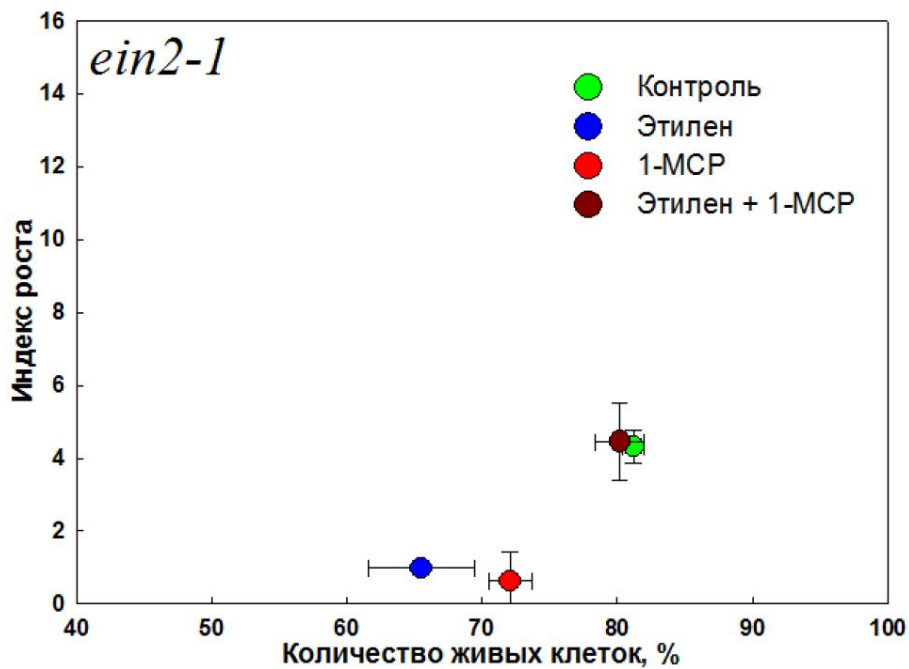


Рис. 32. Жизнеспособность и индексы роста культивируемых клеток *A. thaliana ein2-1* после культивирования в газовых колоколах, содержащих воздух, 20 мкл/л этилена, 100 нл/л 1-МСП, либо смесь 20 мкл/л этилена и 100 нл/л 1-МСП.

При этом эффект, также как и для суспензии клеток Col-0 (см. Рис. 25), во многом определялся временем по кривой роста, когда применяли обработку экзогенными газами. В случае культуры клеток *ein2-1*, положительный эффект на индекс роста, жизнеспособность и количество S-фазных клеток оказывало их культивирование в смеси 20 мкл/л этилена и 100 нл/л 1-МСП (Рис. 32 и Рис. 33).

Если усреднить все отдельные эксперименты (6–8) по влиянию экзогенных газов, не учитывая время обработки по кривой роста, но учитывая стандартные отклонения в каждом конкретном эксперименте, что, безусловно, приводит к увеличению итоговой ошибки в значениях результирующего графика, то можно увидеть основные отличия между суспензиями Col-0 и *ein2-1* (Рис. 33).

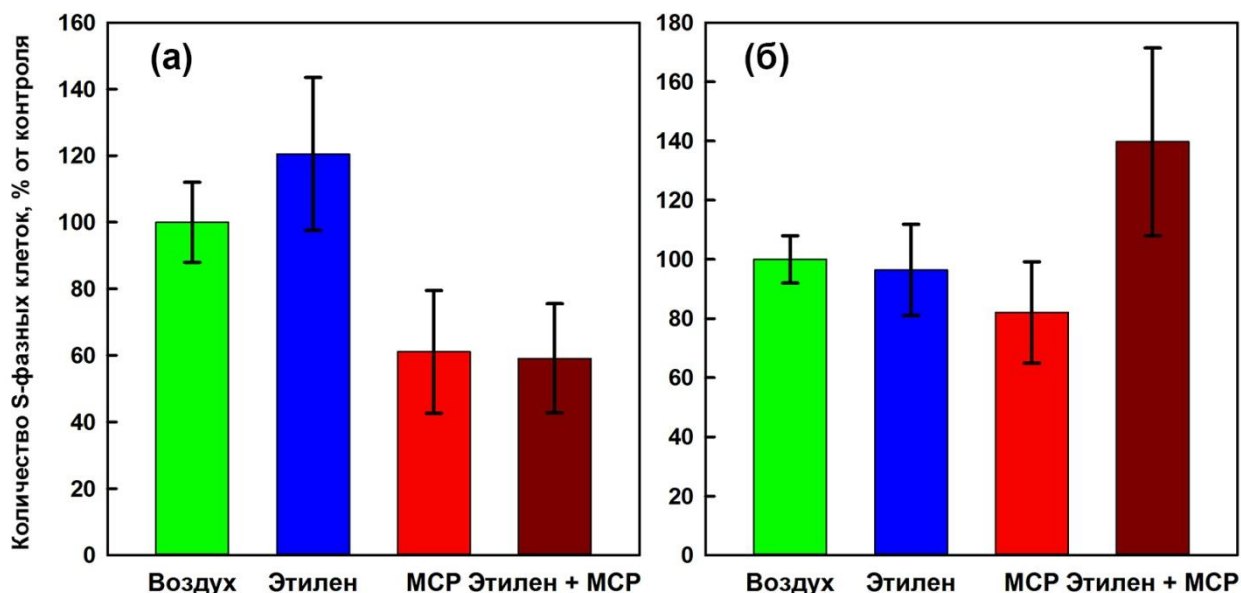


Рис. 33. Изменение количества S-фазных клеток в культурах *A. thaliana* Col-0 (а) и *ein2-1* (б) при культивировании в газовых колоколах, содержащих воздух, 20 мкл/л этилена, 100 нл/л 1-МСП, либо смесь 20 мкл/л этилена и 100 нл/л 1-МСП. Объединённый график для 6–8 независимых экспериментов (биологических повторностей).

Как видно, позитивный эффект на увеличение доли S-фазных клеток, следовательно стимуляцию КЦ, в случае суспензии клеток Col-0 имеет этилен, а негативный эффект имеет 1-МСП и его смесь с этиленом (Рис. 33, а). Клетки *ein2-1* позитивно реагируют на смесь 1-МСП с этиленом, а негативно на 1-МСП (Рис. 33, б). Это означает, что для стимуляции или поддержания пролиферации необходимо восприятие сигнала этилена рецепторами (ингибирование 1-МСП), но дальнейшее проведение сигнала, как в случае *ein2-1* идёт не через EIN2, а по альтернативному пути/путям, которые отъюстированы под определённый уровень исходящего от рецепторов сигнала (эффект смеси этилена и 1-МСП).

3.2.8. Проявление повышенной чувствительности к недостатку кислорода культивируемых клеток *ein2-1*, биохимическая адаптация на уровне гликолиза

В условиях суспензионной культуры клетки испытывают своего рода постоянное «затопление», важнейшим следствием которого является гипоксия. Для

того, чтобы оценить влияние гипоксии на ростовые параметры, жизнеспособность и пролиферативную активность при более значительном кислородном голодании, суспензии клеток Col-0 и *ein2-1* выращивали в атмосфере с 5% O₂ (начальная концентрация) и в контрольных условиях в течение 24 часов (Рис. 33). Жизнеспособность клеток обоих генотипов значительно не изменялась, однако это сказалось на ростовых параметрах. Так, прирост сырого веса замедлился, причём у *ein2-1* в большей степени, чем у Col-0. Ещё более значительные изменения видны в количестве клеток, находящихся на стадии синтеза ДНК.

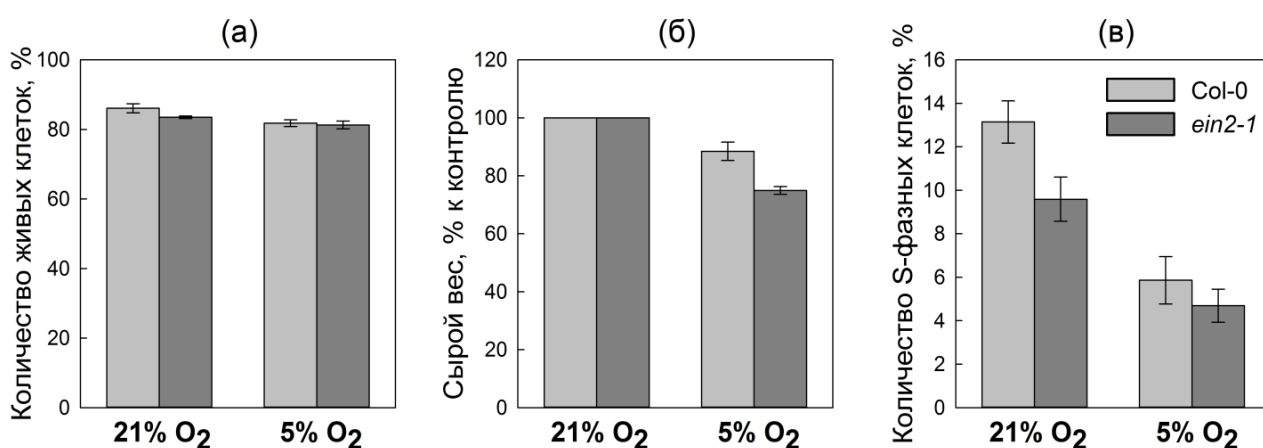


Рис. 34. Жизнеспособность (а), прирост биомассы (б) и количество S-фазных клеток в норме и при действии гипоксии в течение 24 часов на культивируемые клетки Col-0 и *ein2-1*.

Если же условия гипоксии усилить, задавая в герметично закрытые сосуды 5% кислорода и культивируя клетки двое суток, то различия в ответе клеток разных генотипов выглядит более наглядно. В течение первых суток при падении содержания кислорода до полутора процентов жизнеспособность клеток менялась незначительно. На вторые сутки, когда уровень кислорода снижался примерно до 0.2%, жизнеспособность клеток *ein2-1* резко падала. После открытия герметично закрытых сосудов после двухсуточной гипоксии и последующей инкубации в течение суток в полностью открытом состоянии, жизнеспособность клеток *ein2-1* ещё больше снизилась (Рис. 35).

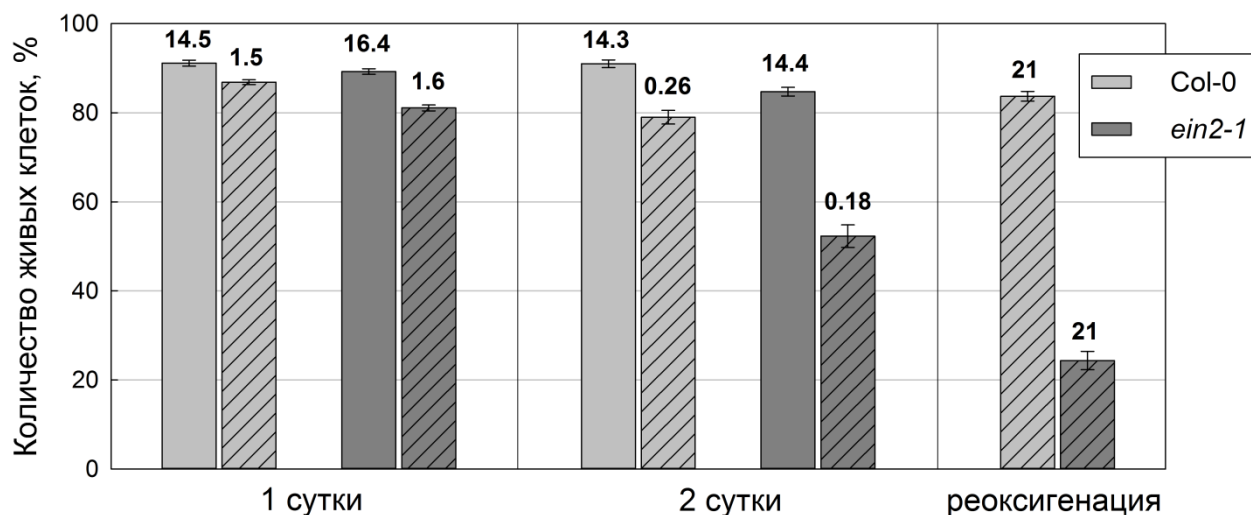


Рис. 35. Жизнеспособность клеток Col-0 и *ein2-1* в норме и при действии гипоксии в течение 24, 48 часов и при последующей реоксигенации. Над столбцами указан процент кислорода в момент определения жизнеспособности. Начальное содержание кислорода при гипоксии — 5.7%. Без штриховки — сосуды, закрытые фольгой; со штриховкой — герметично закрытые сосуды.

Эти результаты совпадают с данными литературы по интактным растениям с мутацией *ein2-5*, которые так же не выдерживают реоксигенацию (Tsai *et al.*, 2014).

На электрофореграмме растворимых белков цитозоля клеток *ein2-1* всегда присутствовала мажорная полоса, которой не было в препаратах из клеток Col-0 и из листьев обоих генотипов (Рис. 36). Этот полипептид был идентифицирован с помощью MALDI-TOF MS как глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа цитозольной локализации, изоформа 2 (GAPC2, At1g13440).

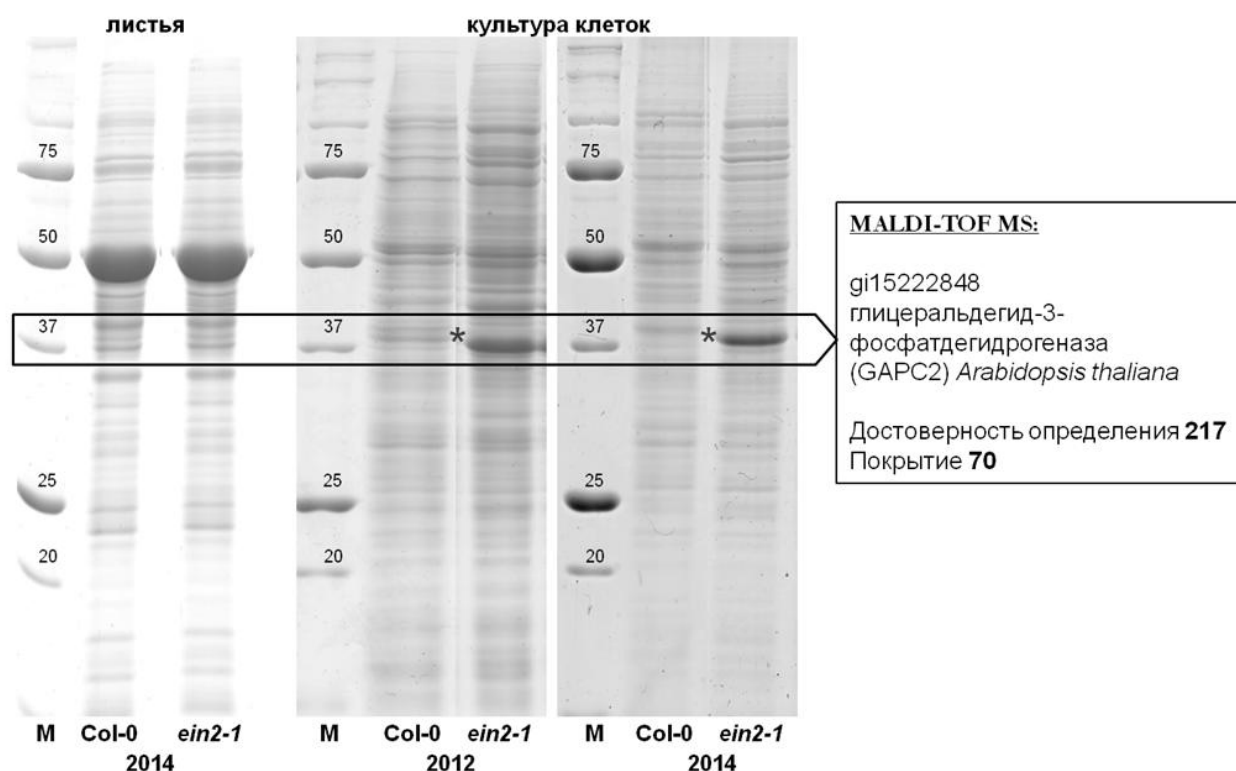


Рис. 36. Денатурирующий электрофорез растворимых белков в ДДС-Na-ПААГ. Идентификация полипептида GAPC2.

Важно отметить, что высокая экспрессия GAPC2 наблюдается и на уровне мРНК (Рис. 37, б). Следовательно, в клетках *ein2-1* идёт активация гликолиза. Этот вывод также подтверждается на уровне активности фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и маркёрного фермента гипоксии — алкогольдегидрогеназы (Рис. 37, а, в). При этом сверхэкспрессия GAPC2 является адаптивным признаком, поскольку выращивание клеток Col-0 в условиях кислородного голодания приводит к появлению в них активности GAPC2 (Рис. 37, вариант WT(H)), и наоборот, выращивание клеток *ein2-1* в условиях повышенной аэрации (Рис. 37, вариант *ein2-1*(N)) приводит к снижению активности GAPC2.

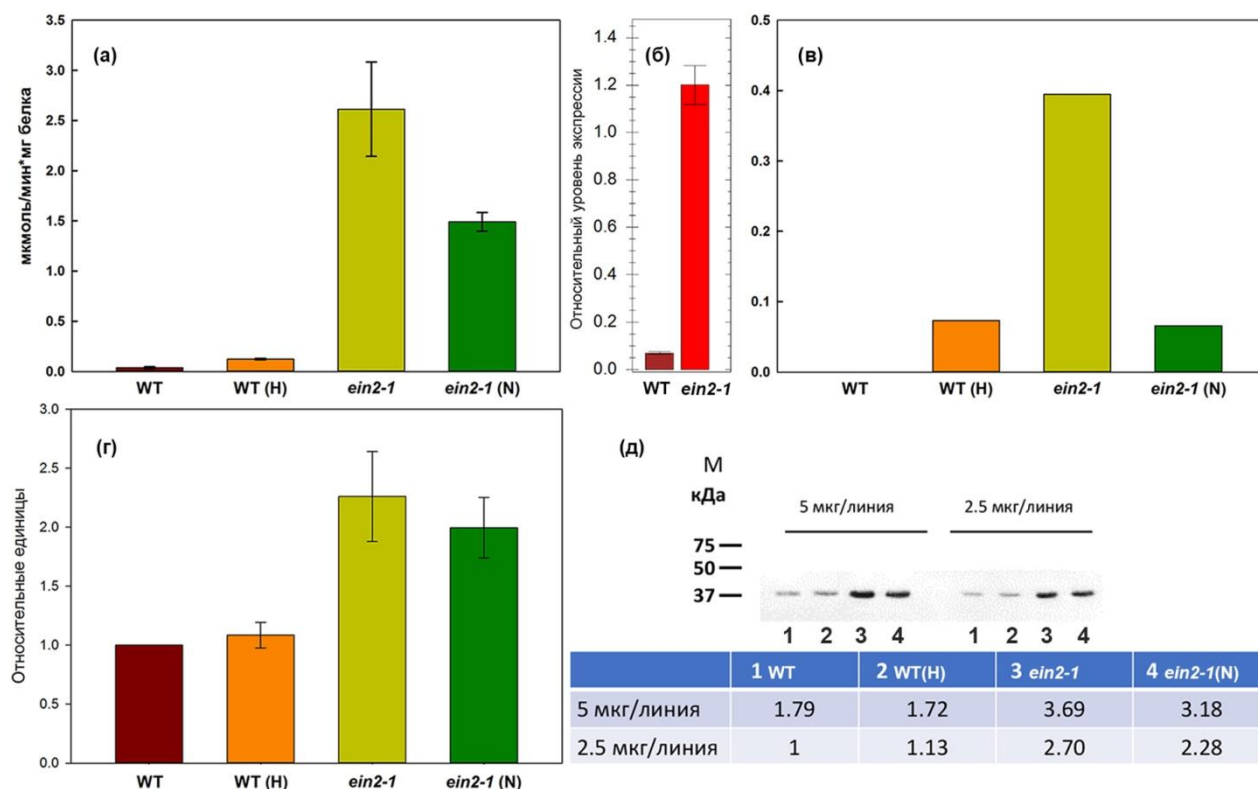


Рис. 37. Активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и экспрессия *GAPC2* в клетках *A. thaliana* Col-0 и *ein2-1*. (а) — Активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в стандартных условиях (WT и *ein2-1*) и при выращивании клеток Col-0 в условиях гипоксии — WT(H), а клеток *ein2-1* в условиях повышенной азрации — *ein2-1*(N). (б) — Относительный уровень экспрессии гена *GAPC2*. (в) — Активность алкогольдегидрогеназы клеток при выше указанных условиях культивирования. (г) — Количественное выражение детектированного антигена *GAPC2* на иммуноблотах (д) растворимых белков клеток Col-0 (WT) и *ein2-1*.

Очевидно, что наблюдается биохимическая адаптация клеток *ein2-1* к жизни в «водной» среде, а значит к не оптимальным условиям снабжения кислородом — гипоксии, что заставило их опираться на гликолиз и на один из главных ферментов гликолиза, которым является *GAPC2*. Это должно приводить к избытку НАД·Н и снижению рН цитозоля, что в свою очередь благоприятствует нитратредуктазе в деле производства NO (Рис. 38), что также подтверждается нашими данными (Novikova *et al.*, 2017).

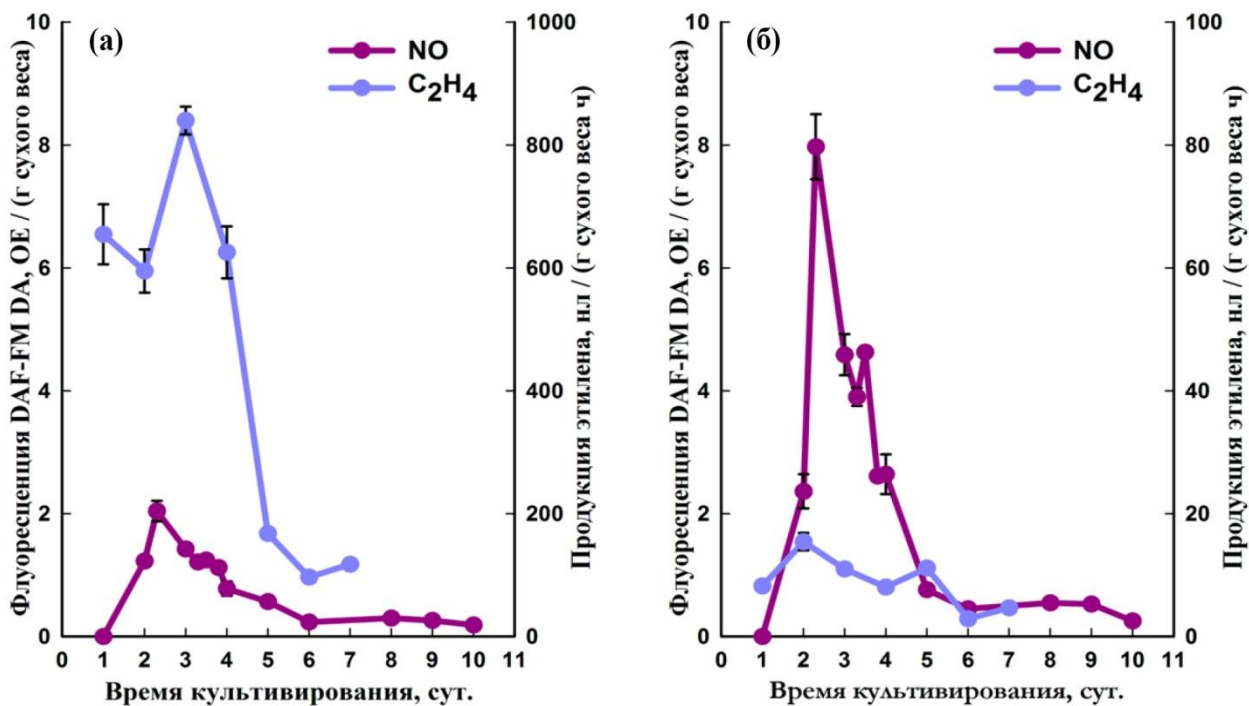


Рис. 38. Продукция оксида азота и этилена культивируемыми клетками *A. thaliana*. Col-0 (а) и *ein2-1* (б).

Избыток NO может приводить к *S*-нитрозилированию Цис114 в молекуле метионаденозилтрансферазы1, что приводит к ингибированию ферментативной активности и дальше к снижению синтеза этилена (Lindermayr *et al.*, 2006). Возможно, подобная ситуация наблюдается в клетках *ein2-1*.

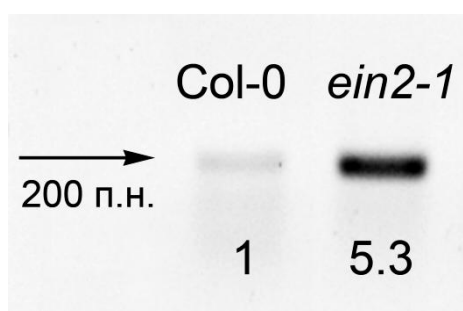


Рис. 39. Уровень транскриптов гена *ERF1* на вторые сутки субкультивирования. Цифры под треками обозначают уровень транскриптов *ERF1* относительно уровня транскриптов референс-гена *UBQ10*.

Наконец, оказалось, что в клетках *ein2-1* конститутивно повышен уровень экспрессия гена *ERF1* (Рис. 39), фактора транскрипции, который является

специфичным индикатором ранних ответов на этилен, подтверждающий работу конечных регуляторных компонентов этиленового сигналинга (Lorenzo, 2003).

Следовательно, для активной пролиферации клеток *ein2-1* нужен сигнал этилена и он проводится альтернативным путём (минуя EIN2), в то время как за устойчивость к гипоксии отвечает канонический путь восприятия и проведения сигнала этилена.

Заключение

Культивируемые клетки растений в качестве объектов для изучения тех или иных физиологических процессов имеют как преимущества, так и ограничения. С одной стороны, существуют физиологические процессы, например адаптация к повышенным концентрациям солей, имеющие как клеточную составляющую, так и обусловленную интегральными взаимодействиями на уровне целого растения. Так, для исследования цитофизиологии модельного растения *Mesembryanthemum crystallinum* в изучении соле- и засухоустойчивости неоднократно использовали культуры клеток. Тем не менее, клетки *in vitro*, полученные из гипокотилей 10–14-дневных растений не обладали солеустойчивостью, а суспензионная культура клеток, полученная из эксплантов шестинедельных листьев, продемонстрировала биохимические ответы, сходные с целым растением (Vera-Estrella *et al.*, 1999). Вероятно, это связано с разным функционированием эпигенетических механизмов контроля процессов солеустойчивости на уровне клеток. С другой стороны, активно делящиеся суспензионные культуры клеток — распространённый объект для изучения механизмов контроля КЦ (Nagata *et al.*, 1992). Это определяется тем, что активная пролиферация является основой существования клеток *in vitro* и тем, что молекулярные механизмы и контроль деления клеток весьма консервативны. Что касается функций фитогормонов в регуляции КЦ растений, то, на наш взгляд, самым загадочным здесь является этилен с его часто противоположным влиянием на одни и те же процессы, а влияние этилена на пролиферацию клеток растений до сих пор остаётся далёким от понимания (Pierik *et al.*, 2006; Van de Poel *et al.*, 2015). Для культивируемых клеток растений, в связи с высокими концентрациями этилена в культуральных сосудах, создаваемыми клетками (Moshkov *et al.*, 2008), вопрос имеет первостепенное значение.

В настоящей работе была сделана попытка выяснить каково влияние этилена на пролиферацию культивируемых клеток *A. thaliana*. Использование суспензионных культур клеток дикого типа (экотип Col-0) и полученных из эксплантов растений с мутациями по гену рецептора этилена (аллель *etr1-1*) или по

компонентам его сигнального пути (аллели *ctr1-1* и *ein2-1*) позволило сделать следующее заключение.

Этилен, даже в больших концентрациях, мало влияет на жизнеспособность клеток дикого типа. Но ингибитор связывания этилена с рецепторами — 1-МСП, пагубно влияет на жизнеспособность и пролиферацию клеток. Экзогенный этилен, при функционирующих путях восприятия и проведения его сигнала, действует на клетки только при низком его эндогенном уровне.

Этилен повышает жизнеспособность и пролиферативную активность клеток *etr1-1*, следовательно, увеличение жизнеспособности и темпов роста при неработающем рецепторе ETR1 в присутствии повышенной концентрации этилена, может говорить о том, что за эти функции отвечают другие рецепторы, имеющие другие константы связывания с фитогормоном.

Эксперименты с культивируемыми клетками мутанта *ein2-1* с дефектом в гене белка — единственного позитивного регулятора этиленового сигналинга (EIN2) показали, что для стимуляции или поддержания пролиферации необходимо восприятие сигнала этилена рецепторами (поскольку ингибирование рецепторов с помощью 1-МСП оказывает негативный эффект), но дальнейшее проведение сигнала, идёт не через EIN2, а по альтернативному пути/путям, которые отъюстированы под определённый уровень исходящего от рецепторов сигнала (эффект смеси этилена и 1-МСП).

Исправно функционирующий путь этиленового сигналинга необходим для купирования эффектов гипоксии, часто возникающих при культивировании клеток в жидкой питательной среде.

Этилен необходим для пролиферации культивируемых клеток *A. thaliana*, как и других клеток растений *in vitro*.

Выводы

1. Для высокой пролиферативной активности и роста клеток *in vitro* необходимо нормальное функционирование этиленового сигнального пути.
2. Активная пролиферация клеток сопровождается интенсивным выделением этилена.
3. Повышение пролиферативной активности при неработающем рецепторе ETR1 в присутствии повышенной концентрации этилена, указывает на то, что за эту функцию отвечают другие рецепторы.
4. Положительное совместное действие этилена и 1-MCP на пролиферативную активность в культуре клеток *ein2-1* указывает на то, что в проведении сигнала, отвечающего за пролиферацию, работают альтернативные пути, в обход EIN2, что подтверждается постоянным и достаточно высоким уровнем транскриптов *ERF1*.
5. Функционирование альтернативного пути передачи сигнала этилена при неработающем EIN2 требует баланса восприятия этилена его рецепторами, которое достигается при совместном воздействии этилена и 1-MCP, возможно за счёт разной аффинности рецепторов к лиганду.
6. Нормальное функционирование пути восприятия и передачи сигнала этилена необходимо для клеток *in vitro* для своевременного устранения эффектов гипоксии.

Список литературы

1. **Бутенко Р.Г.** (1964) Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. Наука, Москва.
2. **Быстрова Е.И., Жуковская Н.В., Ракитин В.Ю., Иванов В.Б.** (2015) Роль этилена в активации деления клеток покоящегося центра в отрезанных корнях кукурузы. *Онтогенез*, **46**, 82–86.
3. **Бычкова Г.С., Бутенко Р.Г.** (1974) Действие ауксина и кинетина на митотический цикл частично синхронизированной популяции клеток женьшеня настоящего (*Panax ginseng* С.А. Меу) *in vitro*. *Доклады Академии Наук СССР*, **217**, 489–492.
4. **Гриф В.Г., Иванов В.Б., Мачс Э.М.** (2002) Клеточный цикл и его параметры у цветковых растений. *Цитология*, **44**, 936–980.
5. **Епифанова О.И.** (1997) Лекции о клеточном цикле. КМК Scientific Press, Москва.
6. **Епифанова О.И., Терских В.В., Полуновский В.А.** (1983) Покоящиеся клетки. Свойства и функции в организме. Наука, Москва.
7. **Иванов В.Б.** (1974) Клеточные основы роста растений. Наука, Москва.
8. **Иванов В.Б.** (2011) Клеточные механизмы роста растений. *Тимирязевские чтения*, **68**, 104 с.
9. **Иванов В.Б.** (1997) Пролиферация клеток в растениях. *Итоги науки и техники. Серия цитология. ВИНТИ*, Москва, 217 с.
10. **Нелюбов Д.Н.** (1901) О действии светильного газа на растения. *Почвоведение*, **2**, 175–178.
11. **Новикова Г.В., Носов А.В., Степанченко Н.С., Фоменков А.А., Мамаева А.С., Мошков И.Е.** (2013) Пролиферация клеток растений и её регуляторы. *Физиология Растений*, **60**, 529–536.
12. **Носов А.В., Фоменков А.А., Мамаева А.С., Соловченко А.Е., Новикова Г.В.** (2014) Дополнительные возможности использования клик-реакции 5-этинил-2'-дезоксинуридина с азидами флюорохромов в изучении клеточного цикла и метаболизма дезоксирибонуклеозидов. *Физиология растений*, **61**, 893–904.
13. **Носов А.М.** (1999) Культура клеток высших растений – уникальная система, модель, инструмент. *Физиология растений*, **46**, 837–844.
14. **Попова Е.В., Носов А.В., Титова М.В., Кочкин Д.В., Фоменков А.А., Куличенко И.Е., Носов А.М.** (2021) Перспективные биотехнологии: Коллекции культур клеток высших растений как основа разработки и

- производства лекарственных препаратов. *Физиология Растений*, **68**, 227–244.
15. **Ракитин В.Ю., Ракитин Л.Ю.** (1986) Определение газообмена и содержания этилена, двуокиси углерода и кислорода в тканях растений. *Физиология Растений*, **33**, 403–413.
 16. **Сабинин Д.А.** (1963) Физиология развития растений. Издательство Академии наук СССР, Москва.
 17. **Степанченко Н.С., Фоменков А.А., Мошков И.Е., Ракитин В.Ю., Новикова Г.В., Носов А.В.** (2012) Взаимодействие фитогормонов в контроле пролиферации культивируемых *in vitro* клеток этилен-нечувствительных мутантов *Arabidopsis thaliana*. *Доклады академии наук*, **442**, 714–717.
 18. **Филин А.Н., Иванов В.Б.** (2016) Влияние 2,4-Д на пролиферацию и растяжение клеток в корнях *Arabidopsis thaliana*. *Физиология растений*, **63**, 174–174.
 19. **Фоменков А.А., Носов А.В., Ракитин В.Ю., Мамаева А.С., Новикова Г.В.** (2014) Цитофизиологические особенности культивируемых клеток *Arabidopsis thaliana* с нарушенным восприятием сигнала этилена рецептором ETR1. *Физиология растений*, **61**, 640–650.
 20. **Фоменков А.А., Носов А.В., Ракитин В.Ю., Суханова Е.С., Мамаева А.С., Собољкова Г.И., Носов А.М., Новикова Г.В.** (2015) Этилен сопровождает пролиферацию культивируемых клеток растений или участвует в её регуляции? *Физиология Растений*, **62**, 839–846.
 21. **Abeles F.B., Morgan P.W., Saltveit M.E. Jr.** (1992) Ethylene in Plant Biology. Academic Press, San Diego.
 22. **Abozeid A., Ying Z., Lin Y., Liu J., Zhang Z., Tang Z.** (2017) Ethylene Improves Root System Development under Cadmium Stress by Modulating Superoxide Anion Concentration in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci*, **8**, 1–15.
 23. **Achard P., Gusti A., Cheminant S., Alioua M., Dhondt S., Coppens F., Beemster G.T.S., Genschik P.** (2009) Gibberellin Signaling Controls Cell Proliferation Rate in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, **19**, 1188–1193.
 24. **Adams D.O., Yang S.F.** (1979) Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc Natl Acad Sci*, **76**, 170–174.
 25. **Alonso J.M., Hirayama T., Roman G., Nourizadeh S., Ecker J.R.** (1999) EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science*, **284**, 2148–2152.
 26. **An F., Zhao Q., Ji Y., Li W., Jiang Z., Yu X., Zhang C., Han Y., He W.,**

- Liu Y., et al.** (2010) Ethylene-induced stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 is mediated by proteasomal degradation of EIN3 binding F-box 1 and 2 that requires EIN2 in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **22**, 2384–2401.
27. **Apelbaum A., Burg S.P.** (1972) Effect of Ethylene on Cell Division and Deoxyribonucleic Acid Synthesis in *Pisum sativum*. *Plant Physiol*, **50**, 117–124.
28. **Araki S., Ito M., Soyano T., Nishihama R., Machida Y.** (2004) Mitotic cyclins stimulate the activity of c-Myb-like factors for transactivation of G2/M phase-specific genes in tobacco. *J Biol Chem*, **279**, 32979–32988.
29. **Bakshi A., Piya S., Fernandez J.C., Chervin C., Hewezi T., Binder B.M.** (2018) Ethylene Receptors Signal via a Noncanonical Pathway to Regulate Abscisic Acid Responses. *Plant Physiol*, **176**, 910–929.
30. **Bakshi A., Shemansky J.M., Chang C., Binder B.M.** (2015) History of Research on the Plant Hormone Ethylene. *J Plant Growth Regul*, 809–827.
31. **Barlow P.W.** (1971) Properties of cells in the root apex. *Rev Fac Agron Univ Nac La Plata*, **47**, 275–301.
32. **Barlow P.W., Pilet P.-E.** (1984) The effect of abscisic acid on cell growth, cell division and DNA synthesis in the maize root meristem. *Physiol Plant*, **62**, 125–132.
33. **Barow M., Meister A.** (2003) Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size. *Plant, Cell Environ*, **26**, 571–584.
34. **Beasley C.A., Eaks I.L.** (1979) Ethylene from alcohol lamps and natural gas burners: Effects on cotton ovules cultured *in vitro*. *In Vitro*, **15**, 263–269.
35. **Bechhoefer J., Rhind N.** (2012) Replication timing and its emergence from stochastic processes. *Trends Genet*, **28**, 374–381.
36. **Beel B., Prager K., Spexard M., Sasso S., Weiss D., Müller N., Heinnickel M., Dewez D., Ikoma D., Grossman A.R., et al.** (2012) A flavin binding cryptochrome photoreceptor responds to both blue and red light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell*, **24**, 2992–3008.
37. **Bennett M.D., Smith J.B.** (1976) Nuclear dna amounts in angiosperms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **274**: 227–274
38. **Biddington NL** (1992) The influence of ethylene in plant tissue culture. *Plant Growth Regul*, **11**, 173–187.
39. **Binder B.M.** (2020) Ethylene signaling in plants. *J Biol Chem*, **295**, 7710–7725.
40. **Binder B.M., Kim H.J., Mathews D.E., Hutchison C.E., Kieber J.J.,**

- Schaller G.E.** (2018) A role for two-component signaling elements in the Arabidopsis growth recovery response to ethylene. *Plant Direct*. doi: 10.1002/pld3.58
41. **Bisson M.M.A., Groth G.** (2010) New insight in ethylene signaling: Autokinase activity of ETR1 modulates the interaction of receptors and EIN2. *Mol Plant*, **3**, 882–889.
 42. **Bleecker A.B., Estelle M.A., Somerville C., Kende H.** (1988) Insensitivity to Ethylene Conferred by a Dominant Mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **241**, 1086–1089.
 43. **Bleecker A.B., Kende H.** (2000) Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**, 1–18.
 44. **Blomme J., Inzé D., Gonzalez N.** (2014) The cell-cycle interactome: A source of growth regulators? *J Exp Bot*, **65**, 2715–2730.
 45. **Boisnard-Lorig C., Colon-Carmona A., Bauch M., Hodge S., Doerner P., Bancharel E., Dumas C., Haseloff J., Berger F.** (2001) Dynamic analyses of the expression of the HISTONE::YFP fusion protein in *Arabidopsis* show that syncytial endosperm is divided in mitotic domains. *Plant Cell*, **13**, 495–509.
 46. **Breuer C., Braidwood L., Sugimoto K.** (2014) Endocycling in the path of plant development. *Curr Opin Plant Biol*, **17**, 78–85.
 47. **Bridgen M.P., Lineberger R.D.** (1981) The effect of hormones on the ethylene production rate of *Nicotiana tabacum* ‘KY 10’ callus *in vitro*. *J Am Soc Hortic Sci*, **16**, 441–441.
 48. **BursSENS S., de Almeida Engler J., Beeckman T., Richard C., Shaul O., Ferreira P., Van Montagu M., Inzé D.** (2000) Developmental expression of the *Arabidopsis thaliana* *CycA2;1* gene. *Planta*, **211**, 623–631.
 49. **Carle S.A., Bates G.W., Shannon T.A.** (1998) Hormonal Control of Gene Expression During Reactivation of the Cell Cycle in Tobacco Mesophyll Protoplasts. *J Plant Growth Regul*, **17**, 221–230.
 50. **Carlew T.S., Allen C.J., Binder B.M.** (2020) Ethylene Receptors in Nonplant Species. *Small Methods*, **4**, 1900266.
 51. **Chae H.S., Kieber J.J.** (2005) Eto Brute? Role of ACS turnover in regulating ethylene biosynthesis. *Trends Plant Sci*, **10**, 291–296.
 52. **Chalutz E., DeVay J.E.** (1969) The production of ethylene *in vitro* and *in vivo* by *Ceratocystis fimbriata* in relation to disease development. *Phytopathology*, **59**, 750–755.
 53. **Chang C., Kwok S.F., Bleecker A.B., Meyerowitz E.M.** (1993) *Arabidopsis* ethylene-response gene *ETR1*: similarity of product to two-component regulators.

- Science*, **262**, 539–544.
54. **Chang C., Stadler R.** (2001) Ethylene hormone receptor action in *Arabidopsis*. *BioEssays*, **23**, 619–627.
 55. **Chen G.-H., Chan Y.-L., Liu C.-P., Wang L.-C.** (2012) Ethylene response pathway is essential for *ARABIDOPSIS A-FIFTEEN* function in floral induction and leaf senescence. *Plant Signal Behav*, **7**, 457–460.
 56. **Chen R., Binder B.M., Garrett W.M., Tucker M.L., Chang C., Cooper B.** (2011) Proteomic responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings treated with ethylene. *Mol Biosyst*, **7**, 2637–2650.
 57. **Cho H.-J., Kwon H.-K., Wang M.-H.** (2010) Expression of Kip-related protein 4 gene (*KRP4*) in response to auxin and cytokinin during growth of *Arabidopsis thaliana*. *BMB Rep*, **43**, 273–278.
 58. **Cho Y.-H., Yoo S.-D.** (2015) Novel connections and gaps in ethylene signaling from the ER membrane to the nucleus. *Front Plant Sci*, **5**, 733.
 59. **Churchman M.L., Brown M.L., Kato N., Kirik V., Hülskamp M., Inzé D., De Veylder L., Walker J.D., Zheng Z., Oppenheimer D.G., et al.** (2006) SIAMESE, a plant-specific cell cycle regulator, controls endoreplication onset in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **18**, 3145–3157.
 60. **Cookson S.J., Granier C.** (2006) A dynamic analysis of the shade-induced plasticity in *Arabidopsis thaliana* rosette leaf development reveals new components of the shade-adaptative response. *Ann Bot*, **97**, 443–452.
 61. **Cookson S.J., Radziejowski A., Granier C.** (2006) Cell and leaf size plasticity in *Arabidopsis*: what is the role of endoreduplication? *Plant Cell Environ*, **29**, 1273–1283.
 62. **Cools T., Iantcheva A., Weimer A.K., Boens S., Takahashi N., Maes S., Van den Daele H., Van Isterdael G., Schnittger A., De Veylder L.** (2011) The *Arabidopsis thaliana* checkpoint kinase WEE1 protects against premature vascular differentiation during replication stress. *Plant Cell*, **23**, 1435–1448.
 63. **Cross F., Roberts J., Weintraub H.** (1989) Simple and Complex Cell Cycles. *Annu Rev Cell Biol*, **5**, 341–396.
 64. **Dan H., Imaseki H., Wasteneys G.O., Kazama H.** (2003) Ethylene stimulates endoreduplication but inhibits cytokinesis in cucumber hypocotyl epidermis. *Plant Physiol*, **133**, 1726–1731.
 65. **David K.M., Couch D., Braun N., Brown S., Grosclaude J., Perrot-Rechenmann C.** (2007) The auxin-binding protein 1 is essential for the control of cell cycle. *Plant J*, **50**, 197–206.
 66. **Depuydt S., Hardtke C.S.** (2011) Hormone Signalling Crosstalk in Plant Growth

- Regulation. *Curr Biol*, **21**, 365–373.
67. **Desvoyes B., De Mendoza A., Ruiz-Trillo I., Gutierrez C.** (2014) Novel roles of plant RETINOBLASTOMA-RELATED (RBR) protein in cell proliferation and asymmetric cell division. *J Exp Bot*, **65**, 2657–2666.
 68. **Doubt S.L.** (1917) The Response of Plants to Illuminating Gas. *Bot Gaz*, **63**, 209–224.
 69. **Dougher T.A.O., Bugbee B.** (2004) Long-term blue light effects on the histology of lettuce and soybean leaves and stems. *J Am Soc Hortic Sci*, **129**, 467–472.
 70. **Dubois M., Van den Broeck L., Inzé D.** (2018) The Pivotal Role of Ethylene in Plant Growth. *Trends Plant Sci*, **23**, 311–323.
 71. **Dudits D., Cserhti M., Miskolczi P., Horvth G.V.** (2007) The growing family of plant cyclin-dependent kinases with multiple functions in cellular and developmental regulation. *Cell Cycle Control Plant Dev*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, pp 1–30.
 72. **Duronio R.J.** (2012) Developing S-phase control. *Genes Dev*, **26**, 746–750.
 73. **Edgar B.A., Zielke N., Gutierrez C.** (2014) Endocycles: a recurrent evolutionary innovation for post-mitotic cell growth. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **15**, 197–210.
 74. **Etchells J.P., Provost C.M., Turner S.R.** (2012) Plant Vascular Cell Division Is Maintained by an Interaction between PXY and Ethylene Signalling. *PLoS Genet*, **8**, e1002997.
 75. **Fabian T., Lorbiecke R., Umeda M., Sauter M.** (2000) The cell cycle genes *cycA1;1* and *cdc2Os-3* are coordinately regulated by gibberellin in planta. *Planta*, **211**, 376–383.
 76. **Ferreira P., Hemerly A., de Almeida Engler J., Bergounioux C., BursSENS S., Van Montagu M., Engler G., Inzé D.** (1994a) Three discrete classes of Arabidopsis cyclins are expressed during different intervals of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci*, **91**, 11313–11317.
 77. **Ferreira P.C., Hemerly A.S., Engler J.D., van Montagu M., Engler G., Inzé D.** (1994b) Developmental expression of the arabidopsis cyclin gene *cyc1At*. *Plant Cell*, **6**, 1763–1774.
 78. **Filkuka J., Kleinwächter V.** (1981) Basic Staining of Cell Nuclei. J.E. Purkyne University Brno, Medical Faculty, Brno.
 79. **Finkelstein R.** (2013) Abscisic Acid Synthesis and Response. *Arab B*, **11**, e0166.
 80. **Francis D., Halford N.G.** (1995) The plant cell cycle. *Physiol Plant*, **93**, 365–374.

81. **Francis D., Kidd A.D., Bennet M.D.** (1985) DNA replication in relation to DNA C values. In JA Bryant, D Francis, eds, cell Div. cycle plants. Cambridge University Press, Cambridge, pp 61–82.
82. **Fuerst R.A., Soni R., Murray J.A., Lindsey K.** (1996) Modulation of cyclin transcript levels in cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, **112**, 1023–1033.
83. **Gamble R.L., Coonfield M.L., Schaller G.E.** (1998) Histidine kinase activity of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci*, **95**, 7825–7829.
84. **Gamborg O.L., Larue T.A.G.** (1971) Ethylene Production by Plant Cell Cultures. *Plant Physiol*, **48**, 399–401.
85. **Gane R.** (1934) Production of Ethylene by Some Ripening Fruits. *Nature*, **134**, 1008–1008.
86. **Gao Z., Chen Y.F., Randlett M.D., Zhao X.C., Findell J.L., Kieber J.J., Schaller G.E.** (2003) Localization of the Raf-like Kinase CTR1 to the Endoplasmic Reticulum of *Arabidopsis* through Participation in Ethylene Receptor Signaling Complexes. *J Biol Chem*, **278**, 34725–34732.
87. **Gavinlertvatana P., Read P.E., Heins R.** (1982) Ethylene levels in flask atmospheres of *Dahlia pinnata* Cav. leaf segments and callus cultured *in vitro*. *J Am Soc Hortic Sci*, **107**, 3–6.
88. **Gendreau E., Traas J., Desnos T., Grandjean O., Caboche M., Höfte H.** (1997) Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, **114**, 295–305.
89. **Genschik P., Marrocco K., Bach L., Noir S., Criqui M.C.** (2014) Selective protein degradation: A rheostat to modulate cell-cycle phase transitions. *J Exp Bot*, **65**, 2603–2615.
90. **Gey G.O., Coffman W.D., Kubicek M.T.** (1952) Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res*, **12**, 264–265.
91. **Gorst J., John P.L., Sek F.** (1991) Levels of p34cdc2-like protein in dividing, differentiating and dedifferentiating cells of carrot. *Planta*, **185**, 304–310.
92. **Gould A.R., King P.J.** (1984) Control of the cell cycle in cultured plant cells. *CRC Crit Rev Plant Sci*, **1**, 315–344.
93. **Granier C., Cookson S.J., Tardieu F., Muller B.** (2007) Cell Cycle and Environmental Stresses. Cell Cycle Control Plant Dev. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, pp 335–355.
94. **Granier C., Tardieu F.** (1998) Is thermal time adequate for expressing the effects of temperature on sunflower leaf development? *Plant, Cell Environ*, **21**, 695–703.

95. **Greilhuber J.** (2005) Intraspecific variation in genome size in angiosperms: identifying its existence. *Ann Bot*, **95**, 91–98.
96. **Greilhuber J., Dolezel J., Lysák M.A., Bennett M.D.** (2005) The origin, evolution and proposed stabilization of the terms “genome size” and “C-value” to describe nuclear DNA contents. *Ann Bot*, **95**, 255–260.
97. **Gutierrez C.** (2016) 25 Years of Cell Cycle Research: What’s Ahead? *Trends Plant Sci*, **21**, 823–833.
98. **Gutierrez C.** (2009) The Arabidopsis Cell Division Cycle. *Arab B*, **7**, e0120.
99. **Guzman P., Ecker J.R.** (1990) Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell*, **2**, 513–523.
100. **Hall A.E., Findell J.L., Schaller G.E., Sisler E.C., Bleecker A.B.** (2000) Ethylene Perception by the ERS1 Protein in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **123**, 1449–1458.
101. **Han L., Li G.-J., Yang K.-Y., Mao G., Wang R., Liu Y., Zhang S.** (2010) Mitogen-activated protein kinase 3 and 6 regulate Botrytis cinerea-induced ethylene production in *Arabidopsis*. *Plant J*, **64**, 114–127.
102. **Harashima H., Dismeyer N., Schnittger A.** (2013) Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends Cell Biol*, **23**, 345–356.
103. **Hartig K., Beck E.** (2005) Endogenous cytokinin oscillations control cell cycle progression of tobacco BY-2 cells. *Plant Biol (Stuttg)*, **7**, 33–40.
104. **Hass C., Lohrmann J., Albrecht V., Sweere U., Hummel F., Yoo S.D., Hwang I., Zhu T., Schäfer E., Kudla J., et al.** (2004) The response regulator 2 mediates ethylene signalling and hormone signal integration in *Arabidopsis*. *EMBO J*, **23**, 3290–3302.
105. **Hemerly A.S., Ferreira P., de Almeida Engler J., Van Montagu M., Engler G., Inzé D.** (1993) *cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *Plant Cell*, **5**, 1711–1723.
106. **Herbert R.J., Vilhar B., Evett C., Orchard C.B., Rogers H.J., Davies M.S., Francis D.** (2001) Ethylene induces cell death at particular phases of the cell cycle in the tobacco TBV-2 cell line. *J Exp Bot*, **52**, 1615–1623.
107. **Hinds P.W., Weinberg R.A.** (1994) Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev*, **4**, 135–141.
108. **Howard A., Pelc S.R.** (1953) Synthesis of Deoxyribonucleic Acid in Normal and Irradiated Cells and Its Relation to Chromosome Breakage. *Heredity (Edinb)*, **6**, 261–273.
109. **Hu Y., Bao F., Li J.** (2000) Promotive effect of brassinosteroids on cell division

- involves a distinct CycD3-induction pathway in *Arabidopsis*. *Plant J*, **24**, 693–701.
110. **Hua J., Chang C., Sun Q., Meyerowitz E.** (1995) Ethylene insensitivity conferred by *Arabidopsis ERS* gene. *Science*, **269**, 1712–1714.
 111. **Hua J., Meyerowitz E.M.** (1998) Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, **94**, 261–271.
 112. **Hua J., Sakai H., Nourizadeh S., Chen Q.G., Bleecker A.B., Ecker J.R., Meyerowitz E.M.** (1998) *EIN4* and *ERS2* are members of the putative ethylene receptor gene family in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **10**, 1321–1332.
 113. **Huang S.J., Chang C.L., Wang P.H., Tsai M.C., Hsu P.H., Chang I.F.** (2013) A type III ACC synthase, *ACS7*, is involved in root gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, **64**, 4343–4360.
 114. **Huang Y., Li H., Hutchison C.E., Laskey J., Kieber J.J.** (2003) Biochemical and functional analysis of *CTR1*, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant J*, **33**, 221–233.
 115. **Humplík J.F., Bergougnoux V., Van Volkenburgh E.** (2017) To Stimulate or Inhibit? That Is the Question for the Function of Abscisic Acid. *Trends Plant Sci*, **22**, 830–841.
 116. **Hunt T.** (1991) Summary: Put Out More Flags. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **56**, 757–769.
 117. **Imamura A., Hanaki N., Umeda H., Nakamura A., Suzuki T., Ueguchi C., Mizuno T.** (1998) Response regulators implicated in His-to-Asp phosphotransfer signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci*, **95**, 2691–2696.
 118. **Inzé D., De Veylder L.** (2006) Cell Cycle Regulation in Plant Development. *Annu Rev Genet*, **40**, 77–105.
 119. **Ito M.** (2014) Expression of mitotic cyclins in higher plants: transcriptional and proteolytic regulation. *Plant Biotechnol Rep*, **8**, 9–16.
 120. **Ito M., Iwase M., Kodama H., Lavis P., Komamine A., Nishihama R., Machida Y., Watanabe A.** (1998) A novel cis-acting element in promoters of plant B-type cyclin genes activates M phase-specific transcription. *Plant Cell*, **10**, 331–341.
 121. **Jablonski J.R., Skoog F.** (1954) Cell Enlargement and Cell Division in Excised Tobacco Pith Tissue. *Physiol Plant*, **7**, 16–24.
 122. **Jackson M.B.** (2008) Ethylene-promoted elongation: An adaptation to submergence stress. *Ann Bot*, **101**, 229–248.
 123. **Jacobs T.** (1992) Control of the cell cycle. *Dev Biol*, **153**, 1–15.

124. **Jagodzik P., Tajdel-Zielinska M., Ciesla A., Marczak M., Ludwikow A.** (2018) Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Plant Hormone Signaling. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2018.01387
125. **Jaillais Y., Chory J.** (2010) Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nat Struct Mol Biol*, **17**, 642–645.
126. **Jakoby M., Schnittger A.** (2004) Cell cycle and differentiation. *Curr Opin Plant Biol*, **7**, 661–669.
127. **Ji Y., Guo H.** (2013) From endoplasmic reticulum (ER) to nucleus: EIN2 bridges the gap in ethylene signaling. *Mol Plant*, **6**, 11–14.
128. **Jia R.-D., Guo C.-C., Xu G.-X., Shan H.-Y., Kong H.-Z.** (2014) Evolution of the cyclin gene family in plants. *J Syst Evol*, **52**, 651–659.
129. **John P.C.L.** (2007) Hormonal Regulation of Cell Cycle Progression and its Role in Development. *Cell Cycle Control Plant Dev.* Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, pp 311–334.
130. **Joo S., Liu Y., Lueth A., Zhang S.** (2008) MAPK phosphorylation-induced stabilization of ACS6 protein is mediated by the non-catalytic C-terminal domain, which also contains the cis-determinant for rapid degradation by the 26S proteasome pathway. *Plant J*, **54**, 129–140.
131. **Jouanneau J.P.** (1971) Contrôle par les cytokinines de la synchronisation des mitoses dans les cellules de tabac. *Exp Cell Res*, **67**, 329–337.
132. **Ju C., Chang C.** (2012) Advances in ethylene signalling: protein complexes at the endoplasmic reticulum membrane. *AoB Plants*, **2012**, pls031.
133. **Ju C., Yoon G.M., Shemansky J.M., Lin D.Y., Ying Z.I., Chang J., Garrett W.M., Kessenbrock M., Groth G., Tucker M.L., et al.** (2012) CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci*, **109**, 19486–19491.
134. **Jurado S., Abraham Z., Manzano C., López-Torrejón G., Pacios L.F., Del Pozo J.C.** (2010) The *Arabidopsis* cell cycle F-box protein SKP2A binds to auxin. *Plant Cell*, **22**, 3891–3904.
135. **Kazama H., Dan H., Imaseki H., Wasteneys G.O.** (2004) Transient exposure to ethylene stimulates cell division and alters the fate and polarity of hypocotyl epidermal cells. *Plant Physiol*, **134**, 1614–1623.
136. **Kejnovsky E., Leitch I.J., Leitch A.R.** (2009) Contrasting evolutionary dynamics between angiosperm and mammalian genomes. *Trends Ecol Evol*, **24**, 572–582.
137. **Kende H.** (1993) Ethylene Biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **44**, 283–307.

138. **Kieber J.J., Rothenberg M., Roman G., Feldmann K.A., Ecker J.R.** (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in arabidopsis, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell*, **72**, 427–441.
139. **Kieber J.J., Schaller G.E.** (2014) Cytokinins. *Arab B*, **12**, e0168.
140. **Kim J., Patterson S.E., Binder B.M.** (2013) Reducing jasmonic acid levels causes *ein2* mutants to become ethylene responsive. *FEBS Lett*, **587**, 226–230.
141. **Kinsman E.A., Lewis C., Davies M.S., Young J.E., Francis D., Vilhar B., Ougham H.J.** (1997) Elevated CO₂ stimulates cells to divide in grass meristems: a differential effect in two natural populations of *Dactylis glomerata*. *Plant cell Environ*, **20**, 1309–1316.
142. **Kohli A., Sreenivasulu N., Lakshmanan P., Kumar P.P.** (2013) The phytohormone crosstalk paradigm takes center stage in understanding how plants respond to abiotic stresses. *Plant Cell Rep*, **32**, 945–957.
143. **Komaki S., Sugimoto K.** (2012) Control of the plant cell cycle by developmental and environmental cues. *Plant Cell Physiol*, **53**, 953–964.
144. **Kondorosi E., Roudier F., Gendreau E.** (2000) Plant cell-size control: Growing by ploidy? *Curr Opin Plant Biol*, **3**, 488–492.
145. **Konze J.R., Kwiatkowski G.M.K.** (1981) Rapidly induced ethylene formation after wounding is controlled by the regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthesis. *Planta*, **151**, 327–330.
146. **Kotogány E., Dudits D., Horváth G.V., Ayaydin F.** (2010) A rapid and robust assay for detection of S-phase cell cycle progression in plant cells and tissues by using ethynyl deoxyuridine. *Plant Methods*, **6**, 5.
147. **Kumagai-Sano F., Hayashi T., Sano T., Hasezawa S.** (2007) Cell cycle synchronization of tobacco BY-2 cells. *Nat Protoc*, **1**, 2621–2627.
148. **Lacey R.F., Binder B.M.** (2014) How plants sense ethylene gas – The ethylene receptors. *J Inorg Biochem*, **133**, 58–62.
149. **Laemmli U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
150. **Larue T.A., Gamborg O.L.** (1971) Ethylene Production by Plant Cell Cultures: Variations in Production during Growing Cycle and in Different Plant Species. *Plant Physiol*, **48**, 394–398.
151. **Lee H.O., Davidson J.M., Duronio R.J.** (2009) Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes Dev*, **23**, 2461–2477.
152. **Van Leene J., Hollunder J., Eeckhout D., Persiau G., Van De Slijke E., Stals H., Van Isterdael G., Verkest A., Neiryneck S., Buffel Y., et al.** (2010)

- Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Syst Biol*, **6**, 397.
153. **Lehti-Shiu M.D., Shiu S.-H.** (2012) Diversity, classification and function of the plant protein kinase superfamily. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*, **367**, 2619–2639.
 154. **Li G., Meng X., Wang R., Mao G., Han L., Liu Y., Zhang S.** (2012) Dual-Level Regulation of ACC Synthase Activity by MPK3/MPK6 Cascade and Its Downstream WRKY Transcription Factor during Ethylene Induction in *Arabidopsis*. *PLoS Genet*, **8**, e1002767.
 155. **Li W., Ma M., Feng Y., Li H., Wang Y., Ma Y., Li M., An F., Guo H.** (2015) EIN2-Directed Translational Regulation of Ethylene Signaling in *Arabidopsis*. *Cell*, **163**, 670–683.
 156. **Liang X., Abel S., Keller J.A., Shen N.F., Theologis A.** (1992) The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci*, **89**, 11046–11050.
 157. **Lindermayr C., Saalbach G., Bahnweg G., Durner J.** (2006) Differential inhibition of arabidopsis methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. *J Biol Chem*, **281**, 4285–4291.
 158. **Liu Q., Wen C.-K.** (2012) Cooperative ethylene receptor signaling. *Plant Signal Behav*, **7**, 1009–1013.
 159. **Liu Y.** (2004) Phosphorylation of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Synthase by MPK6, a Stress-Responsive Mitogen-Activated Protein Kinase, Induces Ethylene Biosynthesis in *Arabidopsis*. *PLANT CELL ONLINE*, **16**, 3386–3399.
 160. **Liu Y., Zhang S.** (2004) Phosphorylation of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Synthase by MPK6, a Stress-Responsive Mitogen-Activated Protein Kinase, Induces Ethylene Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**, 3386–3399.
 161. **Lohrmann J., Harter K.** (2002) Plant two-component signaling systems and the role of response regulators. *Plant Physiol*, **128**, 363–369.
 162. **Lorenzo O.** (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 Integrates Signals from Ethylene and Jasmonate Pathways in Plant Defense. *PLANT CELL ONLINE*, **15**, 165–178.
 163. **Love J., Björklund S., Vahala J., Hertzberg M., Kangasjärvi J., Sundberg B.** (2009) Ethylene is an endogenous stimulator of cell division in the cambial meristem of *Populus*. *Proc Natl Acad Sci*, **106**, 5984–5989.
 164. **Mackenzie I.A., Street H.E.** (1970) Studies on the Growth in Culture of Plant Cells: VIII. Production of ethylene by suspension cultures of *Acer pseudoplatanus* L. *J Exp Bot*, **21**, 824–834.

165. **Magyar Z., De Veylder L., Atanassova A., Bakó L., Inzé D., Bögre L.** (2005) The role of the *Arabidopsis E2FB* transcription factor in regulating auxin-dependent cell division. *Plant Cell*, **17**, 2527–2541.
166. **Maluszynska J., Kolano B., Sas-Nowosielska H.** (2013) Endopolyploidy in Plants. In J. Greilhuber, J. Dolezel, J.F. Wendel, eds, *Plant Genome Divers. Vol. 2*. Springer Vienna, Vienna, pp 99–119.
167. **Martinez M.C., Jørgensen J.E., Lawton M.A., Lamb C.J., Doerner P.W.** (1992) Spatial pattern of *cdc2* expression in relation to meristem activity and cell proliferation during plant development. *Proc Natl Acad Sci*, **89**, 7360–7364.
168. **Mayerhofer H., Panneerselvam S., Mueller-Dieckmann J.** (2012) Protein Kinase Domain of CTR1 from *Arabidopsis thaliana* Promotes Ethylene Receptor Cross Talk. *J Mol Biol*, **415**, 768–779.
169. **McCourt P.** (1999) Genetic analysis of hormone signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **50**, 219–243.
170. **McKeon T.A., Fernández-Maculet J.C., Yang S.-F.** (1995) Biosynthesis and Metabolism of Ethylene. In P.J. Davies, ed, *Plant Horm. Physiol. Biochem. Mol. Biol.* Springer Netherlands, Dordrecht, pp 118–139.
171. **McManus M.T.** (2012) The plant hormone ethylene. *Annual Plant Reviews*, **44**.
172. **Mehrnia M., Balazadeh S., Zanon M.-I., Mueller-Roeber B.** (2013) *EBE*, an AP2/ERF transcription factor highly expressed in proliferating cells, affects shoot architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **162**, 842–857.
173. **Meir S., Philosoph-Hadas S., Epstein E., Aharoni N.** (1985) Carbohydrates stimulate ethylene production in tobacco leaf discs : I. Interaction with auxin and the relation to auxin metabolism. *Plant Physiol*, **78**, 131–138.
174. **Melaragno J., Mehrotra B., Coleman A.** (1993) Relationship between Endopolyploidy and Cell Size in Epidermal Tissue of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **5**, 1661–1668.
175. **Menges M., De Jager S.M., Gruissem W., Murray J.A.H.** (2005) Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J*, **41**, 546–566.
176. **Menges M., Murray J.A.H.** (2002) Synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *Plant J*, **30**, 203–212.
177. **Menges M., Samland A.K., Planchais S., Murray J.A.H.** (2006) The D-Type Cyclin *CYCD3;1* Is Limiting for the G1-to-S-Phase Transition in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **18**, 893–906.
178. **Merchante C., Alonso J.M., Stepanova A.N.** (2013) Ethylene signaling: Simple

- ligand, complex regulation. *Curr Opin Plant Biol*, **16**, 554–560.
179. **Merchante C., Brumos J., Yun J., Hu Q., Spencer K.R., Enríquez P., Binder B.M., Heber S., Stepanova A.N., Alonso J.M.** (2015) Gene-Specific Translation Regulation Mediated by the Hormone-Signaling Molecule EIN2. *Cell*, **163**, 684–697.
 180. **Mészáros T., Miskolczi P., Ayaydin F., Pettkó-Szandtner A., Peres A., Magyar Z., Horváth G.V., Bakó L., Fehér A., Dudits D.** (2000) Multiple cyclin-dependent kinase complexes and phosphatases control G2/M progression in alfalfa cells. *Plant Mol Biol*, **43**, 595–605.
 181. **Meyer Y., Aspart L.** (1983) The First Mitotic Cycle of Mesophyll Protoplasts. *Protoplasts*, 1983. Birkhäuser Basel, Basel, pp 93–100.
 182. **Millenaar F.F., Cox M.C.H., van Berkel Y.E.M. de J., Welschen R.A.M., Pierik R., Voeselek L.A.J.C., Peeters A.J.M.** (2005) Ethylene-Induced Differential Growth of Petioles in *Arabidopsis*. Analyzing Natural Variation, Response Kinetics, and Regulation. *Plant Physiol*, **137**, 998–1008.
 183. **Minocha S.C.** (1979) Abscisic Acid Promotion of Cell Division and DNA Synthesis in Jerusalem Artichoke Tuber Tissue Cultured *in vitro*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, **92**, 327–339.
 184. **Miyazaki J.H., Shang F.Y.** (1987) Inhibition of the methionine cycle enzymes. *Phytochemistry*, **26**, 2655–2660.
 185. **Miyazawa Y., Sakai A.** (2006) Tobacco BY-2 Cells as a Model for Differentiation in Heterotrophic Plant Cells. In T. Nagata, K. Matsuoka, D. Inzé, eds, *Tob. BY-2 Cells From Cell. Dyn. to Omi*. Springer Berlin Heidelberg, pp 119–132.
 186. **Moshkov I.E., Novikova G.V., Hall M.A., George E.F.** (2008) Plant Growth Regulators III: Gibberellins, Ethylene, Abscisic Acid, their Analogues and Inhibitors; Miscellaneous Compounds. In E.F. George, ed, *Plant Propag. by Tissue Cult.* 3rd Ed., 3rd ed. Springer, pp 227–281.
 187. **Moussatche P., Klee H.J.** (2004) Autophosphorylation Activity of the *Arabidopsis* Ethylene Receptor Multigene Family. *J Biol Chem*, **279**, 48734–48741.
 188. **Mukund S., Robacker C., Shewfelt R.** (1988) Callus and suspension cultures of tomato fruits for postharvest studies. *J Am Soc Hortic Sci*, **23**, 754–754.
 189. **Murashige T., Skoog F.** (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant*, **15**, 473–497.
 190. **Myers P.N., Setter T.L., Madison J.T., Thompson J.F.** (1990) Abscisic Acid inhibition of endosperm cell division in cultured maize kernels. *Plant Physiol*, **94**, 1330–1336.

191. **Nagata T., Hasezawa S., Inzé D., eds.** (2004) Tobacco BY-2 Cells. doi: 10.1007/978-3-662-10572-6
192. **Nagata T., Matsuoka K., Inzé D. eds.** (2006) Tobacco BY-2 Cells: From Cellular Dynamics to Omics. doi: 10.1007/3-540-32674-X
193. **Nagata T., Nemoto Y., Hasezawa S.** (1992) Tobacco BY-2 cell line as the “HeLa” cell in the cell biology of higher plants. *Int Rev Cytol*, **132**, 1–30.
194. **Neljubow D.** (1901) Über die horizontale Nutation der Stengel von *Pisum sativum* und einiger anderer Pflanzen. *Beihefte Bot Cent*, **10**: 128–138.
195. **Nešković M., Petrović J., Radojević L.J., Vujičić R.** (1977) Stimulation of Growth and Nucleic Acid Biosynthesis at Low Concentration of Abscisic Acid in Tissue Culture of *Spinacia oleracea*. *Physiol Plant*, **39**, 148–154.
196. **Nieuwland J., Menges M., Murray J.A.H.** (2007) The Plant Cyclins. *Cell Cycle Control Plant Dev.* Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, pp 31–61.
197. **Nishihama R., Kohchi T.** (2013) Evolutionary insights into photoregulation of the cell cycle in the green lineage. *Curr Opin Plant Biol*, **16**, 630–637.
198. **Nosov A.M.** (2012) Application of cell technologies for production of plant-derived bioactive substances of plant origin. *Appl Biochem Microbiol*, **48**, 609–624.
199. **Nosov A.V., Smolenskaya I.N., Nosova A.L.** (1983) Cytophotometric study of DNA-fuchsin complex in cultured mesophyll protoplasts of *Nicotiana tabacum* and *Vicia faba*. *Biol Plant*, **25**, 173–179.
200. **Nougarède A., Rondet P., Landré P., Rembur J.** (1987) Effet d’un traitement par l’acide abscisique sur la division cellulaire, les teneurs en ADN et l’élargissement du bourgeon cotylédonaire de plants de pois décapités. *Can J Bot*, **65**, 907–915.
201. **Novikova G.V., Mur L.A.J., Nosov A.V., Fomenkov A.A., Mironov K.S., Mamaeva A.S., Shilov E.S., Rakitin V.Y., Hall M.A.** (2017) Nitric Oxide Has a Concentration-Dependent Effect on the Cell Cycle Acting via EIN2 in *Arabidopsis thaliana* Cultured Cells. *Front Physiol*, **8**, 1–11.
202. **Novikova G.V., Moshkov I.E., Smith A.R., Hall M.A.** (2000) The effect of ethylene on MAPKinase-like activity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*, **474**, 29–32.
203. **Oh E., Zhu J.-Y., Wang Z.-Y.** (2012) Interaction between BZR1 and PIF4 integrates brassinosteroid and environmental responses. *Nat Cell Biol*, **14**, 802–809.
204. **Oh M.-H., Honey S.H., Tax F.E.** (2020) The Control of Cell Expansion, Cell Division, and Vascular Development by Brassinosteroids: A Historical Perspective. *Int J Mol Sci*, **21**, 1743.

205. **Okello R.C.O., de Visser P.H.B., Heuvelink E., Marcelis L.F.M., Struik P.C.** (2016) Light mediated regulation of cell division, endoreduplication and cell expansion. *Environ Exp Bot*, **121**, 39–47.
206. **Ortega-Martínez O., Pernas M., Carol R.J., Dolan L.** (2007) Ethylene modulates stem cell division in the *Arabidopsis thaliana* root. *Science*, **317**, 507–510.
207. **Pasternak T., Miskolczi P., Ayaydin F., Mészáros T., Dudits D., Fehér A.** (2000) Exogenous auxin and cytokinin dependent activation of CDKs and cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Growth Regul*, **32**, 129–141.
208. **Peiser G.D., Wang T.T., Hoffman N.E., Yang S.F., Liu H.W., Walsh C.T.** (1984) Formation of cyanide from carbon 1 of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid during its conversion to ethylene. *Proc Natl Acad Sci*, **81**, 3059–3063.
209. **Pellicer J., Fay M.F., Leitch I.J.** (2010) The largest eukaryotic genome of them all? *Bot J Linn Soc*, **164**, 10–15.
210. **Peng H.P., Lin T.Y., Wang N.N., Shih M.C.** (2005) Differential expression of genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis* during hypoxia. *Plant Mol Biol*, **58**, 15–25.
211. **Peres A., Churchman M.L., Hariharan S., Himanen K., Verkest A., Vandepoele K., Magyar Z., Hatzfeld Y., Van Der Schueren E., Beemster G.T.S., et al.** (2007) Novel Plant-specific Cyclin-dependent Kinase Inhibitors Induced by Biotic and Abiotic Stresses. *J Biol Chem*, **282**, 25588–25596.
212. **Péret B., De Rybel B., Casimiro I., Benková E., Swarup R., Laplaze L., Beeckman T., Bennett M.J.** (2009) *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci*, **14**, 399–408.
213. **Pierik R., Tholen D., Poorter H., Visser E.J.W., Voesenek L.A.C.J.** (2006) The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends Plant Sci*, **11**, 176–183.
214. **Pitts R.J., Cernac A., Estelle M.** (1998) Auxin and ethylene promote root hair elongation in *Arabidopsis*. *Plant J*, **16**, 553–560.
215. **Van de Poel B., Smet D., Van Der Straeten D.** (2015) Ethylene and Hormonal Cross Talk in Vegetative Growth and Development. *Plant Physiol*, **169**, 61–72.
216. **Polko J.K., Voesenek L.A.C.J., Peeters A.J.M., Pierik R.** (2011) Petiole hyponasty: An ethylene-driven, adaptive response to changes in the environment. *AoB Plants*, **11**, 1–11.
217. **Polyn S., Willems A., De Veylder L.** (2015) Cell cycle entry, maintenance, and exit during plant development. *Curr Opin Plant Biol*, **23**, 1–7.

218. **Pozhvanov G., Sharova E., Medvedev S.** (2021) Microgravity modelling by two-axial clinorotation leads to scattered organisation of cytoskeleton in *Arabidopsis* seedlings. *Funct Plant Biol*, **48**, 1062.
219. **Pozhvanov G.A., Gobova A.E., Bankin M.P., Vissenberg K., Medvedev S.S.** (2016) Ethylene is involved in the actin cytoskeleton rearrangement during the root gravitropic response of *Arabidopsis thaliana*. *Russ J Plant Physiol*, **63**, 587–596.
220. **Del Pozo J.C., Manzano C.** (2014) Auxin and the ubiquitin pathway. Two players-one target: The cell cycle in action. *J Exp Bot*, **65**, 2617–2632.
221. **Qiao F., Petrasek J., Nick P.** (2010) Light can rescue auxin-dependent synchrony of cell division in a tobacco cell line. *J Exp Bot*, **61**, 503–510.
222. **Qiao H., Shen Z., Huang S.-S.C, Schmitz R.J., Urich M.A., Briggs S.P., Ecker J.R.** (2012) Processing and Subcellular Trafficking of ER-Tethered EIN2 Control Response to Ethylene Gas. *Science*, **338**, 390–393.
223. **Richard C., Lescot M., Inzé D., De Veylder L.** (2002) Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene expression in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, **69**, 167–176
224. **Ridge I., Amarasinghe I.** (1984) Ethylene and growth control in the fringed waterlily (*Nymphaoides peltata*): Stimulation of cell division and interaction with buoyant tension in petioles. *Plant Growth Regul*, **2**, 235–249.
225. **Riou-Khamlichi C., Huntley R., Jacquard A., Murray J.A.** (1999) Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science*, **283**, 1541–1544.
226. **Roman G., Lubarsky B., Kieber J.J., Rothenberg M., Ecker J.R.** (1995) Genetic analysis of ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*: five novel mutant loci integrated into a stress response pathway. *Genetics*, **139**, 1393–409.
227. **Rost T.L., Sammut M.** (1982) Regulation of Cell Division in Pea Root Tips After Wounding : A Possible Role for Ethylene. *Protoplasma*, **111**, 1–9.
228. **Rostovtsev V.V., Green L.G., Fokin V.V., Sharpless K.B.** (2002) A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew Chemie Int Ed*, **41**, 2596–2599.
229. **Sablowski R.** (2016) Coordination of plant cell growth and division: collective control or mutual agreement? *Curr Opin Plant Biol*, **34**, 54–60.
230. **Sablowski R., Carnier Dornelas M.** (2014) Interplay between cell growth and cell cycle in plants. *J Exp Bot*, **65**, 2703–2714.
231. **Sacco E., Hasan M.M., Alberghina L., Vanoni M.** (2012) Comparative analysis

- of the molecular mechanisms controlling the initiation of chromosomal DNA replication in yeast and in mammalian cells. *Biotechnol Adv*, **30**, 73–98.
232. **Sakai H., Hua J., Chen Q.G., Chang C., Medrano L.J., Bleecker A.B., Meyerowitz E.M.** (1998) *ETR2* is an *ETR1*-like gene involved in ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci*, **95**, 5812–5817.
 233. **Sala F., Parisi B., Burroni D., Amileni A.R., Pedrali-Noy G., Spadari S.** (1980) Specific and reversible inhibition by aphidicolin in the alpha-like DNA polymerase of plant cells. *FEBS Lett*, **117**, 93–98.
 234. **Salehin M., Estelle M.** (2015) Ethylene Prunes Translation. *Cell*, **163**, 543–544.
 235. **Salic A., Mitchison T.J.** (2008) A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci*, **105**, 2415–2420.
 236. **Sasidharan R., Voesenek L.A.C.J.** (2015) Ethylene-Mediated Acclimations to Flooding Stress. *Plant Physiol*, **169**, 3–12.
 237. **Satyanarayana A., Kaldis P.** (2009) Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene*, **28**, 2925–39.
 238. **Sauer M., Kleine-Vehn J.** (2011) AUXIN BINDING PROTEIN1: the outsider. *Plant Cell*, **23**, 2033–2043.
 239. **Schaller G.E., Bleecker A.B.** (1995) Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the *Arabidopsis ETR1* gene. *Science*, **270**, 1809–1811.
 240. **Schaller G.E., Street I.H., Kieber J.J.** (2014) Cytokinin and the cell cycle. *Curr Opin Plant Biol*, **21**, 7–15.
 241. **Schenk R.U., Hildebrandt A.C.** (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot*, **50**, 199–204.
 242. **Scholes D.R., Paige K.N.** (2015) Plasticity in ploidy: a generalized response to stress. *Trends Plant Sci*, **20**, 165–175.
 243. **Schott-Verdugo S., Müller L., Classen E., Gohlke H., Groth G.** (2019) Structural Model of the *ETR1* Ethylene Receptor Transmembrane Sensor Domain. *Sci Rep*, **9**, 8869.
 244. **Sebastià C.H., Hardin S.C., Clouse S.D., Kieber J.J., Huber S.C.** (2004) Identification of a new motif for CDPK phosphorylation *in vitro* that suggests ACC synthase may be a CDPK substrate. *Arch Biochem Biophys*, **428**, 81–91.
 245. **Shakeel S.N., Gao Z., Amir M., Chen Y.-F., Rai M.I., Haq N.U., Schaller G.E.** (2015) Ethylene Regulates Levels of Ethylene Receptor/CTR1 Signaling Complexes in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, **290**, 12415–12424.

246. **Shakeel S.N., Wang X., Binder B.M., Schaller G.E.** (2013) Mechanisms of signal transduction by ethylene: overlapping and non-overlapping signalling roles in a receptor family. *AoB Plants*, **5**, 1–16.
247. **Sherr C.J., Roberts J.M.** (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, **13**, 1501–1512.
248. **Sieberer B.J., Kieft H., Franssen-Verheijen T., Emons A.M.C., Vos J.W.** (2009) Cell proliferation, cell shape, and microtubule and cellulose microfibril organization of tobacco BY-2 cells are not altered by exposure to near weightlessness in space. *Planta*, **230**, 1129–1140.
249. **Šimová I., Herben T.** (2012) Geometrical constraints in the scaling relationships between genome size, cell size and cell cycle length in herbaceous plants. *Proc R Soc B Biol Sci*, **279**, 867–875.
250. **Sisler E.C., Serek M.** (1997) Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments. *Physiol Plant*, **100**, 577–582.
251. **Skoog F., Miller C.O.** (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp Soc Exp Biol*, **11**, 118–130.
252. **Skottke K.R., Yoon G.M., Kieber J.J., DeLong A.** (2011) Protein Phosphatase 2A Controls Ethylene Biosynthesis by Differentially Regulating the Turnover of ACC Synthase Isoforms. *PLoS Genet*, **7**, e1001370.
253. **Smalle J., Haegman M., Kurepa J., Van Montagu M., Straeten D.V.** (1997) Ethylene can stimulate *Arabidopsis* hypocotyl elongation in the light. *Proc Natl Acad Sci*, **94**, 2756–2761.
254. **Solano R., Stepanova A., Chao Q., Ecker J.R.** (1998) Nuclear events in ethylene signaling: A transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes Dev*, **12**, 3703–3714.
255. **Soni R., Carmichael J.P., Shah Z.H., Murray J.A.** (1995) A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell*, **7**, 85–103.
256. **Sorrell D.A., Menges M., Healy J.M., Deveaux Y., Amano C., Su Y., Nakagami H., Shinmyo A., Doonan J.H., Sekine M., et al.** (2001) Cell cycle regulation of cyclin-dependent kinases in tobacco cultivar Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiol*, **126**, 1214–1223.
257. **Street H.E.** (1977) Plant tissue and cell culture. Blackwell Scientific, Oxford, UK.
258. **Street I.H., Aman S., Zubo Y., Ramzan A., Wang X., Shakeel S.N., Kieber J.J., Schaller G.E.** (2015) Ethylene Inhibits Cell Proliferation of the *Arabidopsis* Root Meristem. *Plant Physiol*, **169**, 338–350.

259. **Sugimoto-Shirasu K., Roberts K.** (2003) “Big it up”: Endoreduplication and cell-size control in plants. *Curr Opin Plant Biol*, **6**, 544–553.
260. **Swift H.H.** (1950a) The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proc Natl Acad Sci*, **36**, 643–654.
261. **Swift H.H.** (1950b) The desoxyribose nucleic acid content of animal nuclei. *Physiol Zool*, **23**, 169–198.
262. **Takahashi N., Kajihara T., Okamura C., Kim Y., Katagiri Y., Okushima Y., Matsunaga S., Hwang I., Umeda M.** (2013) Cytokinins Control Endocycle Onset by Promoting the Expression of an APC/C Activator in *Arabidopsis* Roots. *Curr Biol*, **23**, 1812–1817.
263. **Takatsuka H., Umeda M.** (2014) Hormonal control of cell division and elongation along differentiation trajectories in roots. *J Exp Bot*, **65**, 2633–2643.
264. **Tanaka Y., Nose T., Jikumaru Y., Kamiya Y.** (2013) ABA inhibits entry into stomatal-lineage development in *Arabidopsis* leaves. *Plant J*, **74**, 448–457.
265. **Tank J.G., Pandya R.V., Thaker V.S.** (2014) Phytohormones in regulation of the cell division and endoreduplication process in the plant cell cycle. *RSC Adv*, **4**, 12605–12613.
266. **Tatsuki M., Mori H.** (2001) Phosphorylation of Tomato 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid Synthase, LE-ACS2, at the C-terminal Region. *J Biol Chem*, **276**, 28051–28057.
267. **Taylor G., Tricker P.J., Zhang F.Z., Alston V.J., Miglietta F., Kuzminsky E.** (2003) Spatial and Temporal Effects of Free-Air CO₂ Enrichment (POPFACE) on Leaf Growth, Cell Expansion, and Cell Production in a Closed Canopy of Poplar. *Plant Physiol*, **131**, 177–185.
268. **Thimann K.V.** (1992) Antagonism and similarities between cytokinins, abscisic acid and auxin (mini review). In M. Kaminek, D.W.S. Mok, E. Zažímalová, eds, *Physiol. Biochem. cytokinins plants*. SPB Academic Publishing, pp 395–400.
269. **Thomas D. des S., Murashige T.** (1979) Volatile emissions of plant tissue cultures. *In Vitro*, **15**, 654–658.
270. **Tourasse N.J., Li W.H.** (2000) Selective constraints, amino acid composition, and the rate of protein evolution. *Mol Biol Evol*, **17**, 656–664.
271. **Tromas A., Paponov I., Perrot-Rechenmann C.** (2010) AUXIN BINDING PROTEIN 1: functional and evolutionary aspects. *Trends Plant Sci*, **15**, 436–446.
272. **Tsai K.J., Chou S.J., Shih M.C.** (2014) Ethylene plays an essential role in the recovery of *Arabidopsis* during post-anaerobiosis reoxygenation. *Plant, Cell Environ*, **37**, 2391–2405.

273. **Tsuchisaka A., Theologis A.** (2004) Heterodimeric interactions among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase polypeptides encoded by the *Arabidopsis* gene family. *Proc Natl Acad Sci*, **101**, 2275–2280.
274. **Tsuchisaka A., Yu G., Jin H., Alonso J.M., Ecker J.R., Zhang X., Gao S., Theologis A.** (2009) A combinatorial interplay among the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate isoforms regulates ethylene biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, **183**, 979–1003.
275. **Umeda M., Shimotohno A., Yamaguchi M.** (2005) Control of Cell Division and Transcription by Cyclin-dependent Kinase-activating Kinases in Plants. *Plant Cell Physiol*, **46**, 1437–1442.
276. **Van't Hof J.** (1996) DNA Replication in Plants. DNA Replication Eukaryot. Cells. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 1005–1014.
277. **Van't Hof J.** (1966) Experimental control of DNA synthesizing and dividing cells in excised root tips of *Pisum*. *Am J Bot*, **53**, 970–976.
278. **Van't Hof J.** (1973) The regulation of cell division in higher plants. *Brookhaven Symp Biol*, **25**, 152–165.
279. **Vandepoele K., Raes J., De Veylder L., Rouzé P., Rombauts S., Inzé D.** (2002) Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **14**, 903–916.
280. **Velappan Y., Signorelli S., Considine M.J.** (2017) Cell cycle arrest in plants: what distinguishes quiescence, dormancy and differentiated G1? *Ann Bot*, **120**, 495–509.
281. **Vera-Estrella R., Barkla B.J., Bohnert H.J., Pantoja O.** (1999) Salt stress in *Mesembryanthemum crystallinum* L. cell suspensions activates adaptive mechanisms similar to those observed in the whole plant. *Planta*, **207**, 426–435.
282. **De Veylder L., Beeckman T., Beemster G.T., Krols L., Terras F., Landrieu I., van der Schueren E., Maes S., Naudts M., Inzé D.** (2001) Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **13**, 1653–1668.
283. **De Veylder L., Beeckman T., Inzé D.** (2007) The ins and outs of the plant cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 655–665.
284. **De Veylder L., Larkin J.C., Schnittger A.** (2011) Molecular control and function of endoreplication in development and physiology. *Trends Plant Sci*, **16**, 624–634.
285. **Wang F., Cui X., Sun Y., Dong C.-H.** (2013) Ethylene signaling and regulation in plant growth and stress responses. *Plant Cell Rep*, **32**, 1099–1109.
286. **Webb D.T., Arias W., Hostos E.** (1986) Callus formation by *G. biloba* embryos on hormone free media controlled by closure and media component. *Phytomorphology*, **36**, 121–127.

287. **Webster P.L., Van't Hof J.** (1969) Dependence of energy and aerobic metabolism of initiation of DNA synthesis and mitosis by **G1** and **G2** cells. *Exp Cell Res*, **55**, 88–94.
288. **Wen X., Zhang C., Ji Y., Zhao Q., He W., An F., Jiang L., Guo H.** (2012) Activation of ethylene signaling is mediated by nuclear translocation of the cleaved EIN2 carboxyl terminus. *Cell Res*, 1613–1616.
289. **Xie Q., Essemine J., Pang X., Chen H., Cai W.** (2020) Exogenous application of abscisic acid to shoots promotes primary root cell division and elongation. *Plant Sci*, **292**, 110385.
290. **Yang S.S., Zhai Q.H.** (2017) Cytosolic GAPDH: a key mediator in redox signal transduction in plants. *Biol Plant*, 1–10.
291. **Yeoman M.M., Davidson A.W.** (1971) Effect of Light on Cell Division in Developing Callus Cultures. *Ann Bot*, **35**, 1085–1100.
292. **Yin K., Ueda M., Takagi H., Kajihara T., Sugamata Aki S., Nobusawa T., Umeda-Hara C., Umeda M.** (2014) A dual-color marker system for in vivo visualization of cell cycle progression in *Arabidopsis*. *Plant J*, **80**, 541–552.
293. **Yoo S.-D., Cho Y.-H., Tena G., Xiong Y., Sheen J.** (2008) Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C₂H₄ signalling. *Nature*, **451**, 789–795.
294. **Yoshizumi T., Tsumoto Y., Takiguchi T., Nagata N., Yamamoto Y.Y., Kawashima M., Ichikawa T., Nakazawa M., Yamamoto N., Matsui M.** (2006) Increased level of polyplody1, a conserved repressor of *CYCLINA2* transcription, controls endoreduplication in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **18**, 2452–2468.
295. **Zdarska M., Cuyacot A.R., Tarr P.T., Yamoune A., Szmikowska A., Hrdinová V., Gelová Z., Meyerowitz E.M., Hejátko J.** (2019) ETR1 Integrates Response to Ethylene and Cytokinins into a Single Multistep Phosphorelay Pathway to Control Root Growth. *Mol Plant*, **12**, 1338–1352.
296. **Zdarska M., Dobisova T., Gelova Z., Pernisova M., Dabravolski S., Hejatkó J.** (2015) Illuminating light, cytokinin, and ethylene signalling crosstalk in plant development. *J Exp Bot*, **66**, 4913–4931.
297. **Zhiponova M.K., Pettkó-Szandtner A., Stelkovics E., Neer Z., Bottka S., Krenács T., Dudits D., Fehér A., Szilák L.** (2006) Mitosis-specific promoter of the alfalfa cyclin-dependent kinase gene (*Medsa;CDKB2;1*) is activated by wounding and ethylene in a non-cell division-dependent manner. *Plant Physiol*, **140**, 693–703.
298. **Zhiponova M.K., Vanhoutte I., Boudolf V., Betti C., Dhondt S., Coppens F., Mylle E., Maes S., González-García M., Caño-Delgado A.I., et al.** (2013) Brassinosteroid production and signaling differentially control cell division and

- expansion in the leaf. *New Phytol*, **197**, 490–502.
299. **Zhong S., Lin Z., Grierson D.** (2008) Tomato ethylene receptor-CTR interactions: Visualization of NEVER-RIPE interactions with multiple CTRs at the endoplasmic reticulum. *J Exp Bot*, **59**, 965–972.
300. **Zobel R.W., Roberts L.W.** (1978) Effects of low concentrations of ethylene on cell division and cytodifferentiation in lettuce pith explants. *Can J Bot*, **56**, 987–990.
301. **Zorinants S.E., Nosov A.V., Monforte-Gonzalez M., Mendes-Zeel M., Loyola-Vargas V.M.** (2003) Variation of nuclear DNA content during somatic embryogenesis and plant regeneration of *Coffea arabica* L. using cytophotometry. *Plant Sci*, **164**, 141–146.

Благодарности

Искренне благодарю Александра Владимировича Носова, моего научного руководителя, который поверил в меня, оказывал всестороннюю поддержку и проявлял безграничное терпение во время совместной работы. Без него этот труд был бы невозможен.

Особо хочу поблагодарить Галину Викторовну Новикову, которая до самого последнего момента была предана тому делу, которому мне посчастливилось вместе с ней заниматься, всегда была полна новыми идеями и являлась строгим критиком.

Отдельная благодарность Виктору Юрьевичу Ракину, за совместную работу и бесценную помощь в подготовке экспериментов.

Благодарю Марину Сергеевну Профимову, Игоря Евгеньевича Мошкова за бесценные советы, конструктивную критику и поддержку в работе.

Благодарю Марию Владимировну Питову и Елену Владимировну Попову, с которыми мы открываем новые перспективы в нашей работе, и которые дали финальный импульс к защите диссертации.

Благодарю Анну Станиславовну Мамаеву, Анну Алексеевну Зорину, Романа Александровича Сидорова, Константина Андреевича Курбакова за совместную работу и просто за дружеское общение.

Благодарю всех сотрудников Лаборатории биологии культивируемых клеток, Лаборатории молекулярных основ внутриклеточной регуляции, Лаборатории мембран растительных клеток за помощь в проведении экспериментов, обсуждении результатов, тёплую атмосферу и ценные советы.

Бесконечная благодарность моей маме Людмиле Петровне Фоменковой, без которой ничего бы этого не было...