

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)

БИОЛОГИЯ
BIOLOGY

УДК 581.1
DOI: 10.29235/1561-8323-2018-62-2-193-202

Поступило в редакцию 14.02.2018
Received 14.02.2018

С. В. Суховеева, Е. М. Кабачевская, Н. А. Радцевич, академик И. Д. Волотовский

*Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси, Минск,
Республика Беларусь*

**ЗАВИСИМОСТЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ
ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ БРАССИНОСТЕРОИДОВ И ЭТИЛЕНА В КЛЕТКАХ
РАСТЕНИЙ ТОМАТА, ОТ ГРАВИСТИМУЛЯЦИИ ИХ ВЕРХУШЕЧНЫХ ЛИСТЬЕВ**

Аннотация. Исследовали влияние гравистимуляции на изменение экспрессии генов в клетках листьев томата на ранних (15 мин – 3 ч) и поздних (более 3 ч – 24 ч) этапах гравитропического ответа. С использованием ОТ-ПЦР в режиме реального времени показана чувствительность к гравистимуляции экспрессии генов, ассоциированных с функционированием фитогормонов брассиностероидов и этилена. Предварительная обработка растений перед началом гравистимуляции этефоном (источником экзогенного этилена) приводила к увеличению относительного уровня экспрессии изученных генов в ответ на гравистимул.

Ключевые слова: растения томата (*Lycopersicon esculentum* L.), гравитропизм, экспрессия генов, фитогормоны, этилен, брассиностероиды, этефон

Для цитирования: Зависимость экспрессии генов, контролирующих функционирование брассиностероидов и этилена в клетках растений томата, от гравистимуляции их верхушечных листьев / С. В. Суховеева [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2018. – Т. 62, № 2. – С. 193–202. DOI: 10.29235/1561-8323-2018-62-2-193-202

Sviatlana V. Sukhaveyeva, Alena M. Kabachevskaya, Natallia A. Radtsevich, Academician Igor D. Volotovskii

Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

**DEPENDENCE OF EXPRESSION OF GENES CONTROLLING BRASSINOSTEROIDS
AND ETHYLENE ON GRAVISTIMULATION IN CELLS OF TOMATO APICAL LEAVES**

Abstract. The influence of gravistimulation on the gene expression level in tomato leaf cells at early (15 minutes – 3 hours) and late (more than 3 hours – 24 hours) stages of the gravitropic response was assessed. The sensitivity of expression of genes coding proteins associated with brassinosteroid and ethylene functioning was determined using real-time RT-PCR. The pre-treatment of tomato plants with ethephon (the source of exogenous ethylene) led to an increase in the relative level of expression of the investigated genes under gravistimulation in the plants.

Keywords: tomato (*Lycopersicon esculentum* L.), gravitropism, gene expression, phytohormones, ethylene, brassinosteroids, ethephon

For citation: Sukhaveyeva S. V., Kabachevskaya A. M., Radtsevich N. A., Volotovskii I. D. Dependence of expression of genes controlling brassinosteroids and ethylene on gravistimulation in cells of tomato apical leaves. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2018, vol. 62, no. 2, pp. 193–202 (in Russian). DOI: 10.29235/1561-8323-2018-62-2-193-202

Введение. Важнейшей особенностью растительного организма является способность органов растения располагаться и расти в определенном направлении по отношению к вектору гравитационного поля Земли, получившая название гравитропизма. Различные органы растения приспособлены к росту в направлении к центру земного шара (положительный гравитропизм), либо в противоположном направлении (отрицательный гравитропизм). Для корней растений характерен положительный гравитропизм, для надземных органов – отрицательный. При отклоне-

нии (в силу разных причин) того или иного органа от его естественного направления роста запускается гравитропический ответ – сложный комплекс внутри- и межклеточных реакций, позволяющих растению восстановить правильное положение в пространстве.

Понимание молекулярных и физиологических основ формирования гравитропического ответа растений является одной из ключевых проблем современной биологии.

Выделяют три основных этапа формирования гравитропического ответа: восприятие гравитационного сигнала, трансдукция сигнала, развитие ассиметричного ростового ответа, который вызывает изгиб органа растения и, в конечном итоге, восстановление его пространственной ориентации.

В ходе первичного этапа развития гравитропического ответа физический гравитационный стимул воспринимается специализированными растительными органеллами – статолитами. Роль статолитов обычно выполняют амилопласты – непигментированные пластиды, содержащие два или несколько крупных крахмальных зерен. В роли статолитов могут выступать не только амилопласты, но и хлоропласты, аппарат Гольджи, кристаллические включения растительной клетки (например, друзы оксалата кальция). В побегах статолиты чаще всего локализируются в паренхимных клетках статоцитах, формирующих обкладку сосудистых пучков и окружающих сосудистые ткани по всей длине стебля, в то время как в корнях они локализованы в корневом чехлике [1].

При перемещении статолитов под действием силы тяжести в нижнюю часть статоцита запускается процесс восприятия гравитационного сигнала: давление статолитов на мембраны нижней части клетки приводит к их механическому раздражению и инициации перераспределения потоков основного регулятора роста фитогормона ауксина. В результате ассиметричного перераспределения ауксин накапливается преимущественно на нижней стороне гравистимулированного органа. Различие его концентраций приводит к дифференциальному росту растяжением клеток растений на верхней и нижней сторонах зоны гравистимуляции растения, вследствие чего формируется гравитропический изгиб. Рост клеток растений, окруженных жесткой клеточной стенкой (КС), возможен только при временном, обратимом расщеплении элементов, обеспечивающих ее жесткость, что происходит при подкислении внутренней среды КС. Такой рост растяжением получил название «кислый» рост [2].

Рост клеток растяжением достаточно подробно изучен на физиологическом и биохимическом уровнях, однако молекулярно-генетические механизмы этого процесса остаются далекими от своего полного выяснения. Особенно мало работ, посвященных анализу изменений экспрессии генов при развитии гравитропического ответа надземных органов растений. К числу фитогормонов, способных регулировать рост клеток растяжением могут относиться не только ауксины, действие которых уже изучали на уровне экспрессии генов [2], но также брассиностероиды (БС) и этилен [3]. В числе генов-кандидатов на роль участников процесса реализации гравитропического ответа можно рассматривать гены, ассоциированные с функционированием БС и этилена: рецепторную киназу БС *CURL3* (Brassinosteroid leucine-rich repeat receptor kinase), ксилоглюкан-эндотрансгликозилазу *BRUI* (Xyloglucan endotransglycosylase), 1-аминоциклопропан-1-карбонат-синтазу *ACS2* (1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 2) и негативный регулятор этиленового сигнального пути белков *EBF1* (ethylene-insensitive3-binding F-box protein 1).

В ранних исследованиях показано, что стебли гороха под действием этилена замедляют свой рост в длину, утолщаются и формируют изгиб в горизонтальном направлении [4]. Учитывая эти данные, кроме гравитропического воздействия, дополнительным фактором воздействия была выбрана обработка растения этефоном. Этефон (2-хлорэтилфосфоновая кислота) – хорошо растворимое в воде соединение, которое разлагается с выделением этилена. Этилен – важный в практическом отношении фитогормон и обработка культурных растений им или его предшественниками оказывает положительное воздействие на их развитие. Экзогенный этилен должен, предположительно, вызывать некоторые изменения в характере гравитропического ответа на молекулярно-генетическом уровне. Поэтому в наших экспериментах обработка этефоном использовалась как источник этилена для растений томата перед началом их гравистимуляции.

Цель данного исследования – изучение относительной экспрессии *CURL3*, *BRUI*, *ACS2* и *EBF1* под действием гравистимуляции в присутствии или отсутствии этефона.

Материалы и методы исследования. В качестве объекта исследования использовали верхушечные листья 50-дневных растений томата (*Lycopersicon esculentum* L.) сорта «Л1» отечественной селекции. Растения выращивали при 16-часовом световом дне и освещении полихроматическим белым светом (40 Вт, 150 мкмоль м⁻²с⁻¹) при температуре 24 °С. Гравистимуляция растений проводилась путем поворота растений на 90° относительно гравитационного вектора Земли. В таком горизонтальном положении растения выдерживались различные интервалы времени. Для исключения побочного эффекта изменений условий освещенности после поворота растений горизонтально и возможного развития дополнительной фототропической реакции на экспрессию изучаемых генов перед началом гравистимуляции растения помещались в темноту на 24 ч для адаптации к темноте [5].

Томаты экспериментальной группы подвергали обработке раствором этефона (Ethephon C0143–100MG, Sigma) концентрацией 100 мг/л 8 дней по одному разу в день. Обработку осуществляли путем контакта (прикосновения) ватного диска, пропитанного раствором этефона [6], с надземной частью растения в течение 3 с. Для приготовления раствора этефона использовали дистиллированную воду со слабокислым рН 4,5. Надземную часть томатов первой контрольной группы растений по одному разу в сутки обрабатывали дистиллированной водой (рН 4,5) с использованием ватных дисков аналогичным способом в течение 8 дней. Обработка растений экспериментальных групп проводилась до гравистимуляции и адаптации к темноте. Вторым контролем служили листья растений, не подвергавшихся гравистимуляции, находившиеся в темноте тот же период времени, что и гравистимулированные растения.

Выделение общей РНК из растительной ткани проводили с использованием реагента TRISOL в соответствии с коммерческим протоколом Invitrogen (USA). Количество выделенной РНК определялось спектрофотометрически по поглощению при 260 нм. Степень чистоты препаратов оценивалась по соотношению A_{260}/A_{280} ($A_{260}/A_{280} = 2,0$).

Для получения кДНК на матрице РНК использовали реакцию обратной транскрипции (ОТ) с применением обратной транскриптазы вируса мышиной лейкемии Молони (M-MLN – Moloney murine leukemia virus). Реакцию проводили с помощью набора реагентов «RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit» в соответствии со стандартным протоколом (Thermo Scientific). В качестве затравки для синтеза цепи ДНК на РНК-матрице использовали смесь случайных гексамерных праймеров (random hexanucleotide primers). На реакцию брали 2 мкг общей РНК, предварительно обработанной ДНКазой (Deoxyribonuclease I), что позволяло избавиться от возможного загрязнения препарата геномной ДНК. Реакцию проводили в соответствии со стандартным протоколом (Thermo Scientific).

Объем реакционной смеси для амплификации фрагментов кДНК составлял 20 мкл. Для проведения ПЦР использовали набор реагентов «High Fidelity PCR Enzyme Mix». Реакционная смесь содержала 200 мкМ дНТФ, 1 U Taq-полимеразы, 100 нг кДНК. Концентрация ионов магния и праймеров оптимизировалась в ходе экспериментов. ПЦР проводили на амплификаторе MiniOpticon (Bio-Rad) в следующем режиме: начальная денатурация – 95 °С, 3 мин; затем 40 циклов (денатурация – 95 °С, 40 с; отжиг – 56 °С, 30 с; элонгация – 72 °С, 30 с); конечная элонгация – 72 °С, 15 мин; остановка реакции – 10 мин, 10 °С. Перед началом ПЦР реакционные смеси обрабатывались урацилгликозилазой для удаления возможных неспецифических компонентов.

Учитывали число циклов, необходимое для амплификации праймера до того количества, которое давало реакцию флуоресценции. Этот момент носит наименование C_p – точка пересечения (англ. crossin point) и позволяет провести расчет количества амплификата. Расчет и анализ полученных данных проводили с использованием компьютерной программы расчета относительной экспрессии нуклеопротеинов REST-MCS (Relative Expression Software Tool) Multiple Condition Solver (version 2), разработанной M. W. Pfaffl и соавт. в Германии. Группа экспертов, проверявшая этот метод расчета экспрессии генов, отметила точность, воспроизводимость данных этой программы и ее пригодность для расчетов межгрупповых и индивидуальных соотношений [7].

При определении экспрессии генов указанная программа использует относительную величину R , выводимую из формулы

$$R = E^{(\Delta C_p \text{ target gene} - C_p \text{ ref gene})},$$

где E (эффективность) выражает величину, на которую увеличивается концентрация мРНК в течение одного цикла; C_p – количество циклов до начала кривой флюоресценции; *ref gene* – ген сравнения (контроля); *target gene* – целевой ген; Δ – разница между средним значением C_p в группе обследуемых и средним значением референтного гена.

Найденная величина R отображает, насколько искомым (таргетный) ген активнее по показателю экспрессии по сравнению с покоящимся геном. Численное значение R является безразмерной величиной и отражает содержание транскриптов в пробе. Все данные приводятся в сравнении с уровнем референтного гена (*rRNA*), считающегося наиболее стабильным и принимаемым за точку отсчета в нормализованных результатах. Статистические данные признавались достоверными при величине $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Обнаружено, что при действии гравистимуляции в верхушечных листьях томата наблюдается изменение уровня относительной экспрессии генов *CURL3*, *BRU1*, *ACS2*, *EBF1*.

Оценка изменений относительной экспрессии гена *CURL3* на транскрипционном уровне показала постепенное увеличение содержания транскриптов данного гена, начиная с 0,5 ч воздействия гравистимула и далее вплоть до 24 ч воздействия (рис. 1, *a*).

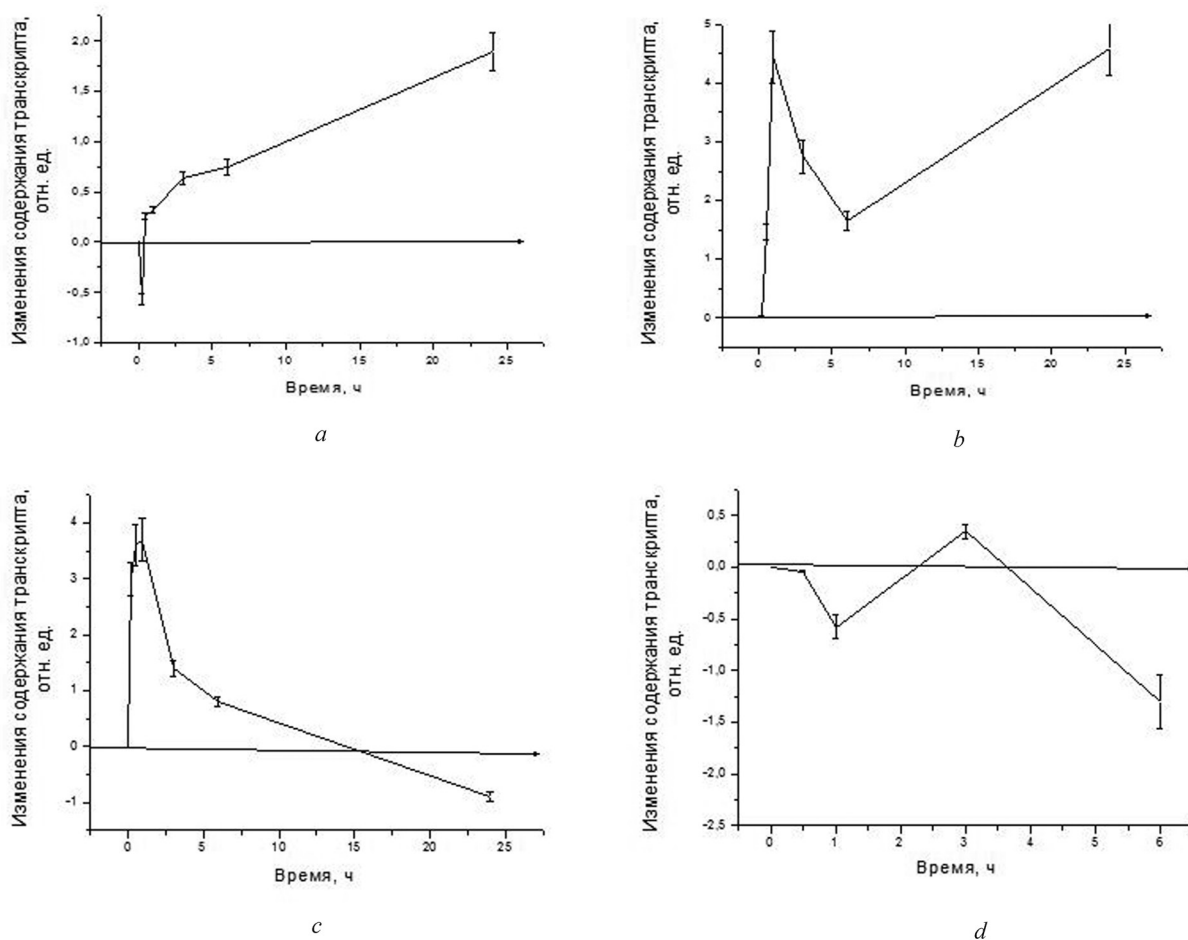


Рис. 1. Изменения уровня относительной экспрессии генов *CURL3* (*a*), *BRU1* (*b*), *ACS2* (*c*), *EBF1* (*d*) в клетках листьев томата при действии гравитропического стимула

Fig. 1. Modulation of relative expression of *CURL3* (*a*), *BRU1* (*b*), *ACS2* (*c*), *EBF1* (*d*) genes by gravistimulation in cells of tomato leaves

Обнаружено, что относительный уровень экспрессии другого гена *BRUI* в клетках листьев томата значительно возрастал на самых ранних этапах гравистимуляции (рис. 1, *b*). Уже через 15 мин после начала гравистимуляции уровень экспрессии гена увеличивался почти в 2 раза, к первому часу воздействия достигал максимума, затем снижался и после 6 ч действия гравистимула вновь постепенно повышался.

Известно, что *CURL3* кодирует синтез брассиностероидной LRR (**leucine-rich repeat**) рецепторной киназы, которая регулирует сигнальный каскад брассиностероидного пути, включая ответ на биотические, абиотические стрессы и стимулирование растительных клеток к элонгации и делению. *BRUI* – ген фермента эндотрансгликозилазы из семейства ХЕТ (Endotransglycosylase), функционирование которой ассоциировано с БС-зависимой сигнализацией и опосредованным ими клеточным ростом растяжением. **Tanaka K. и соавт. было показано, что БС вызывают клеточное удлинение и усиливают гравитропическую реакцию растений [8].** Экзогенно нанесенный на корни арабидопсиса брассинолид (БЛ) усиливал их гравитропический изгиб и длину при низких концентрациях (10⁻¹⁰ М), тогда как высокие концентрации БЛ еще больше увеличивали гравитропический изгиб, но ингибировали рост первичного корня. У брассиностероид-нечувствительных мутантов *br1-301* и *bak1* ответ на гравитропический стимул был менее выраженным [9].

Полученные результаты и приведенные выше литературные данные свидетельствуют о том, что *CURL3* и *BRUI* являются генами-участниками в формировании гравитропического ответа растений.

В последующих экспериментах изучалась возможная восприимчивость гена *ACS2*, кодирующего ключевой фермент биосинтеза этилена аминоклопропан-1-карбонат-синтазу, к действию гравистимула в клетках листьев томата.

Показано, что уровень содержания транскриптов *ACS2* заметно возрастал (более чем в 2 раза) уже через 15 мин после начала воздействия гравистимуляции, достигал максимума к третьему часу воздействия и затем снижался (рис. 1, *c*).

Увеличение синтеза продукта экспрессии гена *ACS2* также наблюдалось в промежутки времени 60–120 мин в стеблях этиолированного гороха при гравистимуляции [10].

Известно, что в момент формирования гравитропического ответа в корнях растений томата синтез этилена индуцируется ауксином, при этом происходит увеличение количества транскриптов генов *ACS*. Анализ ОТ-ПЦР выявил шесть изоформ семейства *ACS*, транскрипция которых регулируется ауксином при воздействии гравистимула: *ACS2*, *ACS4*, *ACS5*, *ACS6*, *ACS8*, *ACS11* [11]. В исследованиях **E. J. Woltering и соавт. по регистрации уровня экспрессии генов семейства *ACS* *Antirrhinum majus* L.** было установлено увеличение содержания транскриптов *ACS3* в зоне изгиба стебля, гена изоформы фермента *ACS1* в зоне изгиба стебля и листьях в течение первых 2 ч гравитропического воздействия [12].

Динамика изменения уровня экспрессии *ACS2* в наших исследованиях сопоставима с результатами научных исследований других авторов, временные отличия могут быть опосредованы различными объектами исследования и регистрацией транскриптов различных изоформ семейства генов *ACS*.

Исследования по определению чувствительности гена *EBF1* к действию гравистимуляции в листьях томата выявили тенденцию к снижению содержания транскриптов *EBF1* при действии гравитропического стимула: на самых ранних этапах ответа наблюдается снижение уровня экспрессии данного гена, затем кратковременное возвращение к контрольному уровню и последующее снижение на поздних этапах ответа (рис. 1, *d*). По амплитуде ответ был не очень высоким. Возможно, экспрессия данного гена дополнительно регулируется на посттранскрипционном уровне.

Известно, что белки группы EBF участвуют в развитии этилен-зависимых реакций через деградацию транскрипционных факторов группы EIN3/EIL (**ethylene-insensitive3/ethylene-insensitive3-like1**). Сигнальная трансдукция этилена начинается с его связывания с рецепторами, а заканчивается транскрипционным каскадом с участием транскрипционных факторов EIN3/EIL-семейства. Белки EBF1 и EBF2, как показано для растений арабидопсиса, физически взаимодей-

ствуют с EIN3/EIL. Сверхэкспрессия *EBF1* ведет к нечувствительности растения к этилену. Наоборот, растения арабидопсиса, несущие мутации в генах *EBF*, приводящие к его выключению, проявляют конститутивный этиленовый ответ и накапливают EIN3-белки в отсутствии фитогормона [13].

Таким образом, из полученных данных видно, что гены, ассоциированные с синтезом и регуляцией активности этилена, проявляют чувствительность к гравистимуляции в надземных органах растений томата. Фитогормон этилен может выполнять существенную роль в развитии гравитропического ответа. Этилен ингибирует рост клеток растяжением, что может быть важно для регуляции направленного роста органа при гравистимуляции, когда на одной его стороне рост активируется, на другой – ингибируется.

Так как гены, ассоциированные с функционированием этилена, проявляли чувствительность к гравистимуляции, в настоящей работе также оценивали влияние экзогенного этилена на характер развития гравитропизма в листьях томата на примере тех же генов, изменение уровня экспрессии которых оценивали при действии одного гравистимула.

Влияние экзогенного этилена на характер изменений экспрессии генов *CURL3* и *BRU1*, ассоциированных с функционированием БС, на фоне гравистимуляции растений томата представлены на рис. 2. В случае гена *CURL3* видно, что содержание транскриптов повышалось уже через 15 мин после начала воздействия, достигало максимума к шестому часу гравистимулирующего воздействия и затем плавно снижалось. В случае одиночного воздействия гравистимула без до-

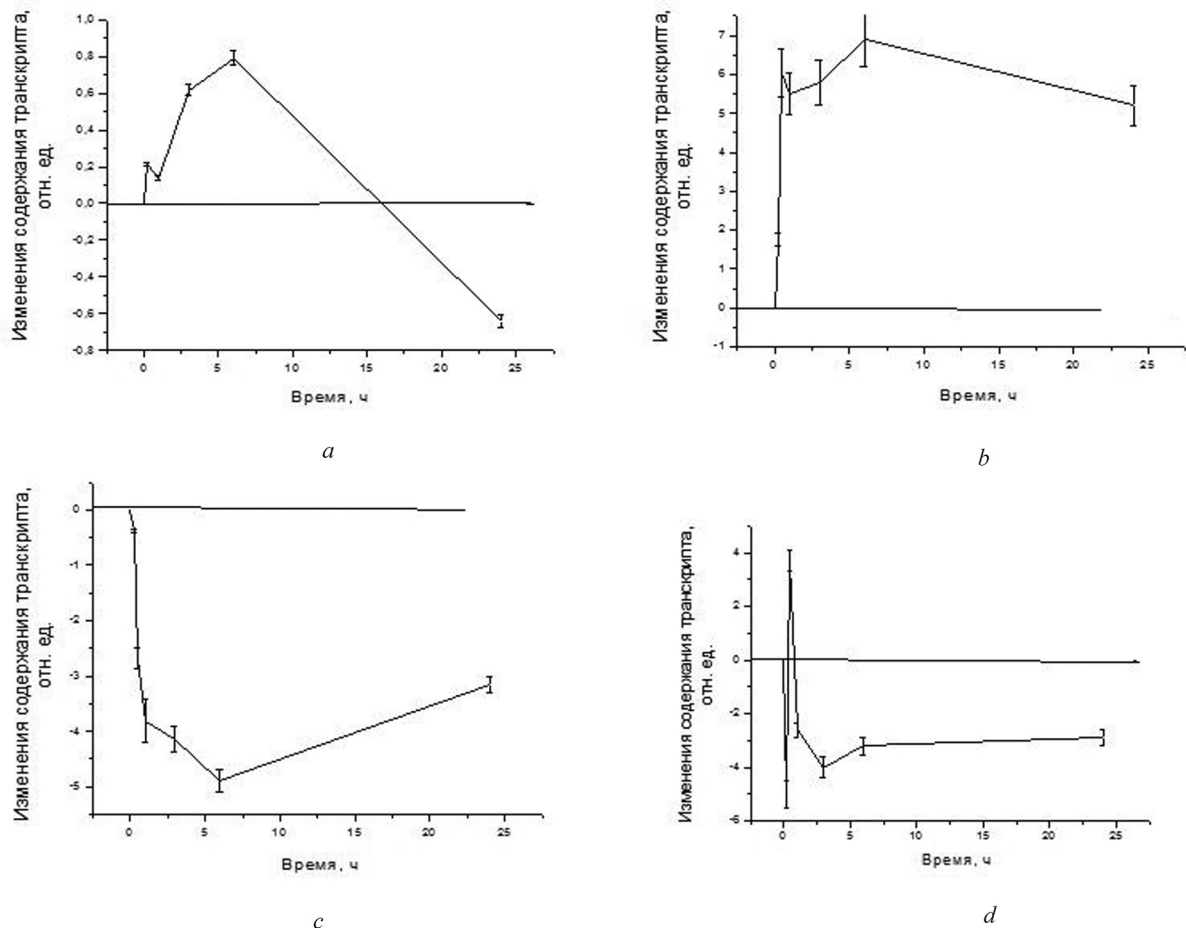


Рис. 2. Изменения уровня относительной экспрессии генов в клетках листьев томата при действии гравитропического стимула: после механического воздействия и обработки этефоном – *CURL3* (a), *BRU1* (c); после механического воздействия и обработки водой – *CURL3* (b), *BRU1* (d)

Fig. 2. Modulation of relative expression of genes by gravistimulation in cells of tomato leaves: after mechanical stress and ethephon treatment – *CURL3* (a), *BRU1* (c); after mechanical stress and water treatment – *CURL3* (b), *BRU1* (d)

полнительной обработки (рис. 1, *a*) повышение уровня экспрессии данного гена наблюдалось позднее (только после 1 ч воздействия) и продолжало возрастать на более поздних этапах воздействия гравистимула, т. е. повышенный уровень экспрессии *CURL3* при гравистимуляции без дополнительного воздействия характерен для поздних этапов ответа, в то время как в присутствии этефона он наблюдается на более ранних этапах ответа.

Воздействие гравистимула с предварительным механическим раздражением без этефона (вода) также приводило к повышению уровня экспрессии *CURL3* (рис. 2, *b*). Можно предположить, что ген *CURL3* участвует в регуляции системин-опосредованной сигнализации и повышение экспрессии гена при гравистимуляции после воздействия механического прикосновения (*touching*) с водой без этефона также связано с пептидной сигнализацией.

Данные по влиянию гравистимуляции на характер изменений экспрессии гена *BRUI*, ассоциированного с функционированием БС и ремоделированием клеточной стенки, после обработки этефоном представлены на рис. 2, *c*. Из рисунка видно, что экспрессия данного гена снижалась на фоне действия гравистимула и этефона и сохранялась на пониженном уровне в течение всего периода наблюдения, в то время как при гравистимулирующем действии без дополнительных обработок экспрессия гена значительно возрастала (рис. 1, *b*). Можно предположить, что экзогенный этилен приводил к инактивации данного фермента, что и повлияло на снижение уровня относительной экспрессии гена *BRUI*. Интересно, что при предварительном механическом воздействии (прикосновение) на растения с водой перед гравистимуляцией также регистрировалось снижение уровня экспрессии данного гена уже после 1 ч воздействия (при наличии быстрого и кратковременного (15–30 мин) всплеска в содержании транскрипта) (рис. 2, *d*). Иными словами, понижение уровня экспрессии *BRUI* обусловлено механическим воздействием, а не этефоном и этот эффект нивелирует активирующее действие гравистимула на экспрессию данного гена.

В литературе имеются данные о том, что сигнальные пути БС при его участии в формировании гравитропической реакции перекрываются с этиленом и снижение синтеза этилена приводит к повышенной выработке БС в клетках *Arabidopsis thaliana* [14], что совпадает с результатами, полученными в наших исследованиях (рис. 2, *a, c*).

Уровень экспрессии *ACS2* при действии гравитропического стимула на фоне действия этефона повышался в течение 15–30 мин, затем начинал падать и снижался ниже контрольной величины уже после 2 ч гравистимуляции (рис. 3, *a*).

Пониженный уровень экспрессии этого гена сохранялся в течение последующего времени наблюдения (до 24 ч). Если сравнить эти результаты с данными, полученными для *ACS2* при действии гравистимула без предварительного механического стресса (рис. 1, *c*), видно, что воздействие только гравистимуляции вызывало значительно более высокое повышение уровня экспрессии *ACS2* на ранних этапах развития (примерно в 2 раза) по сравнению с действием гравистимула после механического воздействия и обработки этефоном. Снижение содержания транскриптов *ACS2* ниже контрольного при гравистимуляции без механического стресса и обработки этефоном наблюдалось только к 15 ч воздействия.

Так как *ACS2* кодирует фермент, участвующий в синтезе эндогенного этилена, полученные результаты выглядят логичными: приток экзогенного фитогормона действует, видимо, по принципу обратной отрицательной связи и снижает потребность растения в активном биосинтезе этилена. Но тем не менее, небольшой рост экспрессии *ACS2* в начале гравистимуляции все же наблюдался, что говорит, по-видимому, о важной роли фитогормона в развитии гравитропизма. При действии гравистимула после механического трения и обработки водой также наблюдалось снижение экспрессии *ACS2* (рис. 3, *b*). Из литературных данных известно, что при механическом воздействии (прикосновение) наблюдается увеличение экспрессии гена *ACS6* [15].

Далее оценивали влияние воздействия гравистимула после обработки этефоном на уровень экспрессии гена *EBF*. Как видно из рис. 3, *c*, содержание транскриптов *EBF* при действии гравитропического стимула на фоне действия этефона значительно увеличивалось на ранних этапах наблюдения и приближалось к контрольному значению к пятому часу гравистимуляции. В то же время экспрессия гена *EBF* снижалась уже на самых ранних этапах действия гравистимулирую-

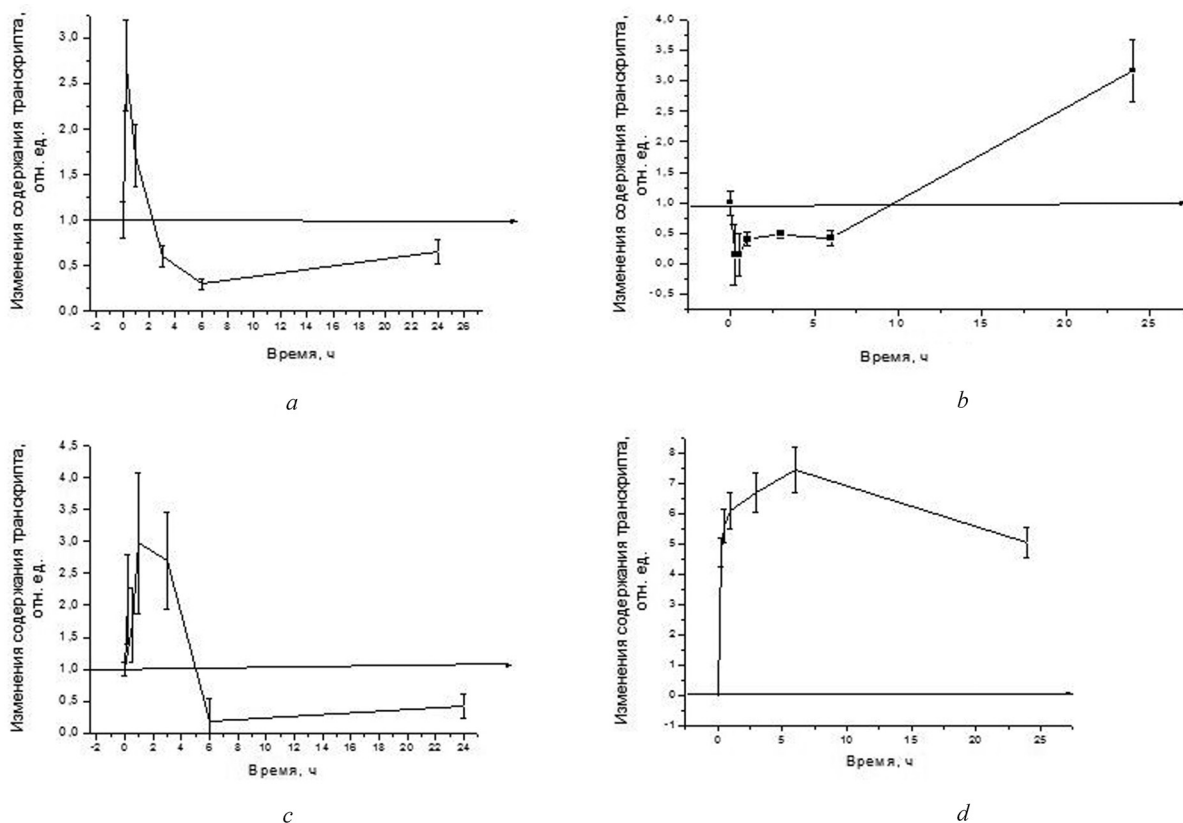


Рис. 3. Изменения уровня относительной экспрессии генов в клетках листьев томата при действии гравитропического стимула: после механического воздействия и обработки этефоном – *ACS2* (a), *EBF1* (c); после механического воздействия и обработки водой – *ACS2* (b), *EBF1* (d)

Fig. 3. Modulation of relative expression of genes by gravistimulation in cells of tomato leaves: after mechanical stress and ethephon treatment – *ACS2* (a), *EBF1* (c); after mechanical stress and water treatment – *ACS2* (b), *EBF1* (d)

щего фактора без дополнительных воздействий. Эти данные можно объяснить тем, что ген *EBF* – негативный регулятор этиленовой сигнализации.

Тот факт, что при одиночной гравистимуляции растений экспрессия *EBF* имела тенденцию к снижению, говорит о важности этиленового сигнала для развития гравитропизма, но интенсивность этого сигнала должна поддерживаться на определенном уровне (что видно и из кратковременного повышения экспрессии данного гена при гравистимуляции без дополнительных воздействий и его последующего снижения, т. е. существования волнообразного характера изменений содержания транскриптов гена *EBF*). Оценка уровня экспрессии гена при действии гравистимула после механического прикосновения (обработки водой) показала его постоянное повышение на всем протяжении наблюдения (рис. 3, d). Видимо, механическое воздействие стимулирует активацию данного гена на поздних этапах ответа.

Закключение. Проведенные исследования позволили выявить в клетках листьев томата изменения уровня относительной экспрессии генов рецепторной киназы брассиностероидов, ксилотрансферазы, 1-аминоциклопропан-1-карбонат-синтазы, сигнальных белков *EBF* при действии гравитропического стимула, гравитропического стимула и механического трения (прикосновения), гравитропического стимула, механического трения и экзогенного этилена.

Изменения генной экспрессии на уровне транскрипции обнаруживаются не в месте непосредственного гравитропического изгиба стебля томата, а в клетках верхушечных листьев растения. Это указывает на то, что к гравистимуляции чувствительны различные ткани и органы растения, что, видимо, позволяет растению быстро адаптироваться к изменениям пространственного положения и восстанавливать нормальную ориентацию в пространстве. Полученные данные поэтому являются отражением существования в растительном организме сложной сети

структурно-функциональных взаимоотношений на уровне различных систем организма и входящих в их состав компонентов.

Можно думать, что в рамках данного исследования удалось охватить лишь часть генов, и не исключено, что гравистимуляция будет сказываться на экспрессии других генов, кодирующих белки, вовлеченные в метаболизм растения.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № Б15-119).

Acknowledgements. The work was supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (project № Б15-119).

Список использованных источников

1. Statolith sedimentation kinetics and force transduction to the cortical endoplasmic reticulum in gravity-sensing *Arabidopsis columella* cells / G. Leitz [et al.] // *Plant Cell*. – 2009. – Vol. 21, N 3. – P. 843–860. DOI: 10.1105/tpc.108.065052
2. Root gravitropism is regulated by a transient lateral auxin gradient controlled by a tipping-point mechanism / L. R. Band [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2012. – Vol. 109, N 12. – P. 4668–4673. DOI: 10.1073/pnas.1201498109
3. Wang, W. The brassinosteroid signaling network – a paradigm of signal integration / W. Wang, M. Y. Bai, Z. Y. Wang // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2014. – Vol. 21. – P. 147–153. DOI: 10.1016/j.pbi.2014.07.012
4. Кулаева, О. Н. Этилен в жизни растений / О. Н. Кулаева // *Соросовский образовательный журн.* – 1998. – № 11. – С. 78–84.
5. Maxwell, K. Chlorophyll fluorescence – a practical guide / K. Maxwell, G. N. Johnson // *Journal of Experimental Botany*. – 2000. – Vol. 51, N 345. – P. 659–668. DOI: 10.1093/jxb/51.345.659
6. Impact of water stress on reproductive development in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) IV. Inhibition of CEPA-induced ethylene production by silver thiosulphate / H. Z. Jaafar [et al.] // *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*. – 2002. – Vol. 30, N 1. – P. 57–65.
7. Bennett, M. Apoptosis in the cardiovascular system / M. Bennett // *Heart*. – 2002. – Vol. 87, N 5. – P. 480–487. DOI: 10.1136/heart.87.5.480
8. Physiological roles of brassinosteroids in early growth of *Arabidopsis*. Brassinosteroids have a synergistic relationship with gibberellin as well as auxin in light-grown hypocotyl elongation / K. Tanaka [et al.] // *Plant Growth Regulation*. – 2003. – Vol. 22, N 3. – P. 259–271. DOI: 10.1007/s00344-003-0119-3
9. Elongation and gravitropic responses of *Arabidopsis* roots are regulated by brassinolide and IAA / T. W. Kim [et al.] // *Plant Cell and Environment*. – 2007. – Vol. 30, N 6. – P. 679–689. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2007.01659.x
10. Steed, C. L. Red light regulation of ethylene biosynthesis and gravitropism in etiolated pea stems / C. L. Steed, L. K. Taylor, M. A. Harrison // *Plant Growth Regulation*. – 2004. – Vol. 43, N 2. – P. 117–125. DOI: 10.1023/b:grow.0000040116.10016.c3
11. Tsuchisaka, A. Unique and overlapping expression patterns among the *Arabidopsis* 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members / A. Tsuchisaka, A. Theologis // *Plant Physiology*. – 2004. – Vol. 136, N 2. – P. 2982–3000. DOI: 10.1104/pp.104.049999
12. An auxin-responsive 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase is responsible for differential ethylene production in gravistimulated *Antirrhinum majus* L. flower stems / E. J. Woltering [et al.] // *Planta*. – 2005. – Vol. 220, N 3. – P. 403–413. DOI: 10.1007/s00425-004-1359-6
13. EIN3-Dependent Regulation of Plant Ethylene Hormone Signaling by Two *Arabidopsis* F Box Proteins / T. Potuschak [et al.] // *Cell*. – 2003. – Vol. 115, N 6. – P. 679–689. DOI: 10.1016/s0092-8674(03)00968-1
14. Brassinosteroid control of shoot gravitropism interacts with ethylene and depends on auxin signaling components / F. Vandenbussche [et al.] // *American Journal of Botany*. – 2013. – Vol. 100, N 1. – P. 215–225. DOI: 10.3732/ajb.1200264
15. Davies Peter J. Plant hormones: Biosynthesis, signal transduction, action! / Peter J. Davies. – Springer Science and Business Media B. V., 2010. – 802 p. DOI: 10.1007/978-94-011-0473-9

References

1. Leitz G., Kang B. H., Schoenwaelder M., Staehelin L. Statolith sedimentation kinetics and force transduction to the cortical endoplasmic reticulum in gravity-sensing *Arabidopsis columella* cells. *The Plant Cell*, 2009, vol. 21, no. 3, pp. 843–860. DOI: 10.1105/tpc.108.065052
2. Band L. R., Wells D. M., Larrieu A., Sun J., Middleton A. M., French A. P., Brunoud G., Sato E. M., Wilson M. H., Peret B., Oliva M., Swarup R., Sairanen I., Parry G., Ljung K., Beeckman T., Garibaldi J. M., Estelle M., Owen M. R., Vissenberg K., Hodgman T. C., Pridmore T. P., King J. R., Vernoux T., Bennett M. J. Root gravitropism is regulated by a transient lateral auxin gradient controlled by a tipping-point mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, vol. 109, no. 12, pp. 4668–4673. DOI: 10.1073/pnas.1201498109
3. Wang W., Bai M. Y., Wang Z. Y. The brassinosteroid signaling network – a paradigm of signal integration. *Current Opinion in Plant Biology*, 2014, vol. 21, pp. 147–153. DOI: 10.1016/j.pbi.2014.07.012
4. Kulaeva O. N. Ethylene in plant life. *Sorosovskii Obrazovatel'nyi Zhurnal = Soros Educational Journal*, 1998, no. 11, pp. 78–84 (in Russian).
5. Maxwell K., Johnson G. N. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 2000, vol. 51, no. 345, pp. 659–668. DOI: 10.1093/jxb/51.345.659

6. Jaafar H. Z., Black C. R., Atherton J. G., Roberts J. A. Impact of water stress on reproductive development in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) IV. Inhibition of CEPA-induced ethylene production by silver thiosulphate. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*, 2002, vol. 30, no. 1, pp. 57–65.
7. Bennett M. Apoptosis in the cardiovascular system. *Heart*, 2002, vol. 87, no. 5, pp. 480–487. DOI: 10.1136/heart.87.5.480
8. Tanaka K., Nakamura Ya., Asami T., Yoshida S., Matsuo T., Okamoto S. Physiological roles of brassinosteroids in early growth of Arabidopsis. Brassinosteroids have a synergistic relationship with gibberellin as well as auxin in light-grown hypocotyl elongation. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2003, vol. 22, no. 3, pp. 259–271. DOI: 10.1007/s00344-003-0119-3
9. Kim T. W., Lee S. M., Joo S. H., Yun H. S., Lee Y., Kaufman P. B., Kirakosyan A., Kim S. H., Nam K. H., Lee J. S., Chang S. C., Kim S. K. Elongation and gravitropic responses of Arabidopsis roots are regulated by brassinolide and IAA. *Plant Cell and Environment*, 2007, vol. 30, no. 6, pp. 679–689. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2007.01659.x
10. Steed C. L., Taylor L. K., Harrison M. A. Red light regulation of ethylene biosynthesis and gravitropism in etiolated pea stems. *Plant Growth Regulation*, 2004, vol. 43, no. 2, pp. 117–125. DOI: 10.1023/b:grow.0000040116.10016.c3
11. Tsuchisaka A., Theologis A. Unique and overlapping expression patterns among the Arabidopsis 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. *Plant Physiology*, 2004, vol. 136, no. 2, pp. 2982–3000. DOI: 10.1104/pp.104.049999
12. Woltering E. J., Balk P. A., Nijenhuis-de Vries M. A., Faivre M., Ruys G., Somhorst D., Philosoph-Hadas S., Friedman H. An auxin-responsive 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase is responsible for differential ethylene production in gravistimulated *Antirrhinum majus* L. flower stems. *Planta*, 2005, vol. 220, no. 3, pp. 403–413. DOI: 10.1007/s00425-004-1359-6
13. Potuschak T., Lechner E., Parmentier Y., Yanagisawa S., Grava S., Koncz C., Genschik P. EIN3-Dependent Regulation of Plant Ethylene Hormone Signaling by Two Arabidopsis F Box Proteins. *Cell*, 2003, vol. 115, no. 6, pp. 679–689. DOI: 10.1016/s0092-8674(03)00968-1
14. Vandebussche F., Callebert P., Zadnikova P., Benkova E., Straeten D. Brassinosteroid control of shoot gravitropism interacts with ethylene and depends on auxin signaling components. *American Journal of Botany*, 2013, vol. 100, no. 1, pp. 215–225. DOI: 10.3732/ajb.1200264
15. Davies Peter J. *Plant hormones: Biosynthesis, signal transduction, action!* Springer Science and Business Media B. V., 2010. 802 p. DOI: 10.1007/978-94-011-0473-9

Информация об авторах

Суховеева Светлана Владимировна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: suhoveevalmbc@mail.ru.

Кабачевская Елена Михайловна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: lmbc@ibp.ogr.by.

Радцевич Наталия Александровна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: natalliya.radtsevich@mail.ru.

Волотовский Игорь Дмитриевич – академик, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: volotovski@yahoo.com.

Information about the authors

Sukhaveyeva Sviatlana Vladimirovna – Junior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Academicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: suhoveevalmbc@mail.ru.

Kabachevskaya Alena Mikhaylouna – Ph. D. (Biology), Senior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Academicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lmbc@ibp.ogr.by.

Radtsevich Natallia Aleksandrovna – Junior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Academicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: natalliya.radtsevich@mail.ru.

Volotovski Igor Dmitrievich – Academician, D. Sc. (Biology), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Academicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: volotovski@yahoo.com.