

И.Ф. Головацкая, Р.А. Карначук

Биологический институт Томского государственного университета (г. Томск)

E-mail: golovatskaya@mail.tomsknet.ru

**РОЛЬ БРАССИНОЛИДА В РЕГУЛЯЦИИ РОСТА
И ГОРМОНАЛЬНОГО БАЛАНСА *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.)
HEYNH. НА ЗЕЛЕНОМ СВЕТУ**

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (грант 08-04-90042-Bel_a)
и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России»
на 2009–2013 гг. (Государственный контракт № П283 от 23.07.2009)

Аннотация. Изучено влияние брассинолида и зеленого света на содержание эндогенных фитогормонов (ИУК, цитокининов и АБК) и морфогенез 7-дневных проростков *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. дикого типа (Col) и мутантной формы (det2), у которых нарушен синтез брассиностероидов. У проростков формы det2 в темноте обнаружено значительно меньшее содержание свободной ИУК и обеих форм АБК и большее содержание цитокининов (зеатина и рибозида зеатина) и связанной ИУК, чем у проростков формы Col. Совместное действие изучаемых факторов синергически увеличивало уровень свободной АБК и площадь семядолей у мутантной формы проростков. Сделан вывод о связи между световым и гормональными сигналами в регуляции роста семядолей *A. thaliana*.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.; фотоморфогенез; зеленый свет; фитогормоны; брассинолид; индолил-3-уксусная кислота; зеатин; рибозид зеатина; абсцизовая кислота.

В связи с прикрепленным образом жизни растения вынуждены быть особенно пластичными в ответах на воздействия окружающей среды. Свет, как наиболее важный внешний фактор, является не только источником энергии для фотосинтеза, но и сигналом, изменяющим программу развития растения. Особый интерес представляет роль зеленого света (ЗС) в жизнедеятельности растений [1]. Его регулирующее действие на растения осуществляется через ряд фоторецепторов [2–4] с участием системы вторичных мессенджеров. Согласно мнению ряда исследователей, в эту систему регуляции вовлечены гормоны. Показано, что гормональный статус растений меняется в зависимости от селективного света [5–7]. Известно, что цитокинины (ЦК) участвуют в регуляции ското- и фотоморфогенеза, но в отношении участия брассиностероидов (БР) в светорегуляции морфогенеза данных недостаточно [7, 8]. В настоящее время показано, что наиболее активный представитель брассиностероидов – брассинолид – регулирует многие процессы в растении от активности протонного насоса, роста клетки, стебля, дифференциации ксилемы, положения листьев, биосинтеза этилена и пигментов, мужской плодови-

тости и до регуляции фотосинтеза, реакций стресса и фотоморфогенеза [9–12]. В связи с этим целью работы являлось изучение роли брассинолида в регуляции уровня фитогормонов (ауксинов, цитокининов и абсцизинов) в процессе роста растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. на ранних этапах онтогенеза на зеленом свету.

Объект и методики исследования

Объектами исследования служили растения двух линий *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. экотипа Columbia (Col) и его мутантная форма *det2* с нарушенным биосинтезом брассиностероидов [13].

Стерильные семена *Arabidopsis* высевали в чашки Петри на жидкую питательную среду $\frac{1}{2}$ МС [14] с добавлением 10^{-7} М брассинолида (БЛ). Брассиностероиды любезно предоставлены профессором В.А. Хрипачом (Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г. Минск). В контроле использовали среду без добавления гормона. Для синхронизации прорастания семена выдерживали в течение 3 сут в темноте при $+6^{\circ}\text{C}$, затем 3 ч освещали с помощью люминесцентных ламп ЛД-40 (33 Вт/м²) и помещали в темноту, где экспонировали 7 сут в условиях полной темноты или ежедневного кратковременного (60 мин) освещения ЗС ($\lambda = 543$ нм, плотность потока квантов 3,0 мкмоль/(м²·с)). Длину hypocотилей и площадь семядолей измеряли у ста проростков каждого варианта.

Количественное определение ИУК, АБК и цитокининов (зеатина и рибозида зеатина – РЗ) проводили с помощью твердофазного иммуноферментного метода [15], используя моноклональные антитела к свободным формам ИУК, АБК и зеатину и антивидовые антитела, меченные пероксидазой («Фармхиминвест», Россия). Измерение плотности растворов определяли на микрофотометре «Specord M-40» при длине волны 492 нм.

Далее на рис. 1, 2 приведены данные в виде средних арифметических со стандартными ошибками.

Результаты и обсуждение

Моделью для изучения фотоморфогенеза были выбраны растения арабидопсис мутантной формы, имеющие многие характеристики светового фенотипа при выращивании в темноте [16]. Световой фенотип растущих в темноте мутантных форм *det2* проявлялся в коротких и утолщенных hypocотилиях, открытых и расширенных семядолях, раскрытых первичных зародышевых листьях. Hypocотиль у таких проростков был короче и толще дикого типа, а семядоли – крупнее, чем Col (рис. 1).

Преждевременное прекращение роста осевого органа и развитие семядолей в темноте показывают, что в растениях без видимой необходимости происходит экспрессия генов, обычно регулируемых светом. Кроме того, нарушается метаболизм БР, т.к. нарушены реакции преобразования ²H-кампестерола в ²H-кампестанол. Растения формы *det2* накапливают только 8–15% уровня кампестанола и меньше 10% других брассиностероидов по сравнению с растения-

ми дикого типа. Такие фенотипические и метаболические различия между мутантным *det2* и диким типами арабидопсис позволяют предполагать важную роль *DET2* в развитии этих растений.

Данные, представленные на рис. 1, показывают участие БЛ в регуляции морфогенеза линий Col и *det2*, различающихся по содержанию эндогенных БР, в темноте и на ЗС. Действие 10^{-7} М БЛ в темноте было малоэффективно в отношении растяжения семядолей обеих линий. Тогда как растяжение гипокотилей проростков дефицитного по БР мутанта *det2* увеличилось (на 27%), частично восстанавливая этилированный фенотип гипокотилей исходной линии. Действие экзогенного БЛ на рост корня зависело от уровня эндогенных БР: при их недостатке (*det2*) растяжение увеличивалось, тогда как при норме (Col) – тормозилось. Аналогичная ростовая реакция растений дикого типа отмечена и другими авторами [17, 18].

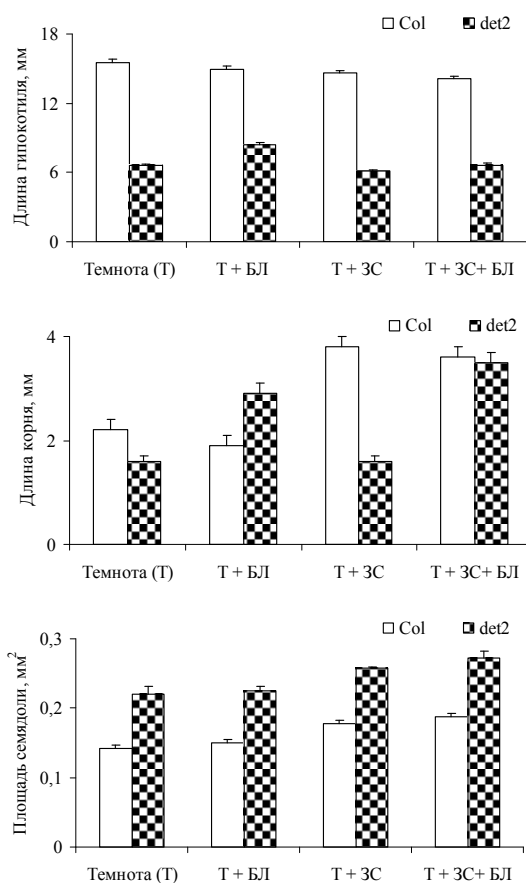


Рис. 1. Влияние brassinоида (БЛ, 10^{-7} М) на морфогенез 7-дневных проростков арабидопсиса в темноте (Т) и при деэтиляции на зеленом свете (ЗС, 543 нм, 3 мкМ·квант/(м²·с), 60 мин)

Дезтиоляция на ЗС низкой интенсивности (543 нм, 3 мкМ·квант/(м²·с)) была малоэффективна в отношении ингибирования роста гипокотилей у обеих линий, но существенно увеличила размеры семядолей (на 17 и 25% соответственно у *det2* и Col). Из полученных данных видно, что чувствительность ростовых реакций к ЗС у мутантного типа арабидопсис была меньше, чем у дикого типа. Возможно, недостаток БР, выступающих в качестве трансдукторов светового сигнала, снижал ответные реакции растений типа *det2* на свет.

Обработка БЛ (10⁻⁷ М) повысила ростовой ответ семядолей на действие ЗС. При этом был отмечен *аддитивный* эффект совместного действия ЗС и экзогенного гормона на рост семядолей дикого типа и *синергический* эффект – на рост семядолей мутантного типа (см. рис. 1). Последняя ростовая реакция была аналогична реакции, отмеченной нами для линий экотипа Landsberg *erecta* (*Ler*) при совместном действии ЗС и другого брассиностероида 24-эпибрассинолида (ЭБЛ) [19]. Кроме того, экзогенный БЛ восстанавливал ростовую реакцию корня растений мутантного типа на ЗС до уровня дикого типа.

Различия в морфогенезе проростков Col и *det2* были обусловлены изменениями их гормонального статуса (рис. 2). В темноте дезтиолированные проростки фенотипа *det2* характеризовались повышенным уровнем ЦК (зеатина и РЗ) и связанной ИУК, пониженным уровнем свободной ИУК и обеих форм АБК по сравнению с этиолированными проростками фенотипа Col. Подобную динамику гормонов отмечали для выращенных на свету растений и другие авторы [7]. Результаты анализа гормонального баланса показали, что мутация гена *DET2* сопряжена с 7-кратным снижением отношения *ИУК свободная/зеатин* и 2-кратным увеличением отношения свободных форм *ИУК/АБК* по сравнению с нормой.

Дезтиоляция на ЗС уменьшила содержание обеих форм ИУК в растениях мутантного фенотипа и только свободной формы гормона в проростках дикого типа. Светозависимое снижение активности ауксинов после облучения красным светом показано другими авторами [20, 21]. ЗС повысил уровень зеатина у дикого типа за счет высвобождения из связанных форм, а у мутантного типа снизил уровень обеих форм ЦК. В дезтиолированных проростках обеих линий уменьшилось содержание свободной и связанной АБК по сравнению с этиолированными проростками.

Обработка 10⁻⁷ М БЛ проростков мутантного фенотипа в темноте по уровню ИУК и ЦК частично напоминала их дезтиоляцию на ЗС. Оба фактора, гормон и свет, действующие по отдельности, устанавливали одинаковый уровень ингибитора роста АБК у обеих линий растений.

Совместное действие факторов (БЛ+ЗС) на проростки арабидопсиса снизило уровень РЗ у обеих линий и синергически увеличило уровень свободной АБК в проростках мутантного типа (рис. 2), что показано нами ранее для *Ler* при действии ЭБЛ на ЗС [19]. Регуляция БЛ гормонального баланса арабидопсиса, вероятно, зависела от светорегулируемого изменения уровня эндогенных гормонов, в том числе и БР [22, 23].

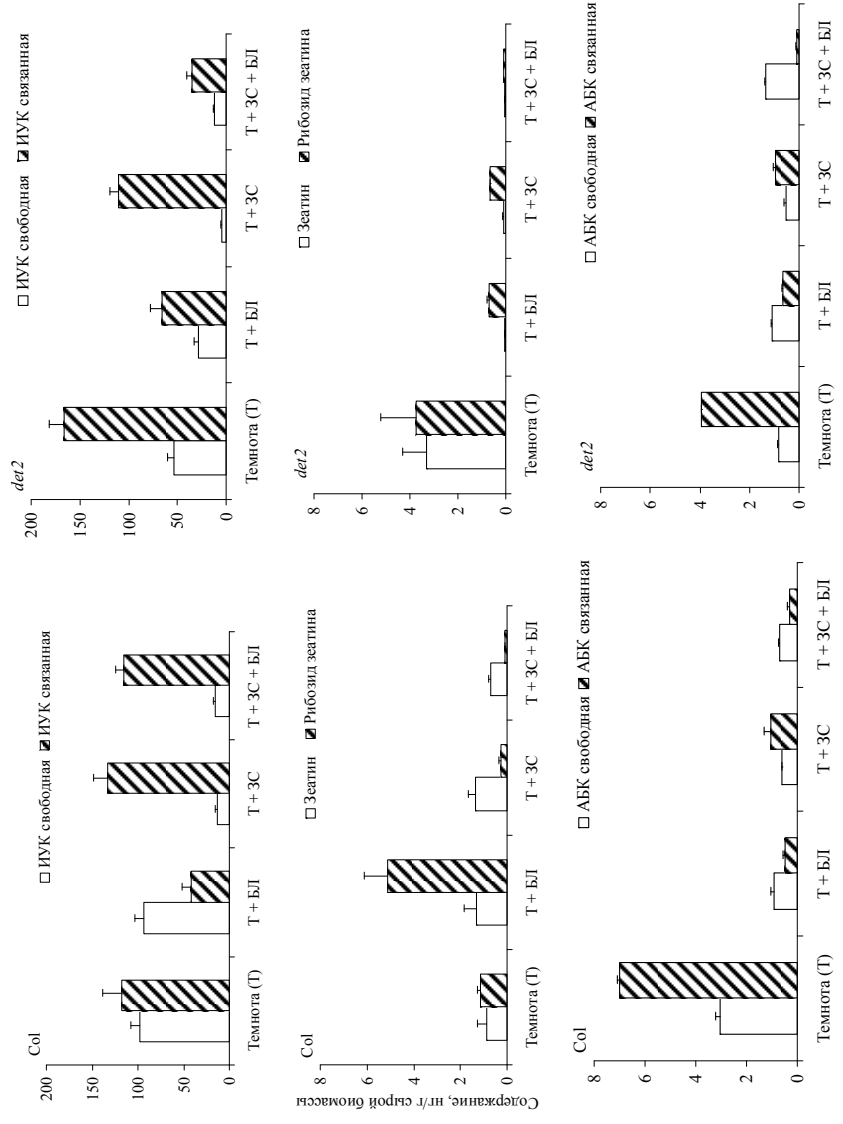


Рис. 2. Влияние брассинолида (БЛ, 10^{-7} М) на содержание фитогормонов в 7-дневных проростках арабидопсиса в темноте (Т) и при деэтиляции на зеленом свете (ЗС, 543 нм, 3 мкМ·квант/(м²·с), 60 мин)

Таким образом, впервые показано, что брассинолид участвует в регуляции морфогенеза на начальных этапах онтогенеза *A. thaliana* в темноте и при деэтиоляции на зеленом свете. Брассинолид изменяет баланс эндогенных фитогормонов. Аддитивный или синергический характер совместного действия брассинолида и зеленого света с длиной волны 543 нм на рост семядолей разных линий арабидопсиса проявляется через изменение уровня эндогенных фитогормонов, в том числе и уровня АБК (*det2*).

Полученные данные позволяют предполагать участие брассиностероидов в трансдукции сигнала зеленого света при регуляции фотоморфогенеза растений арабидопсиса.

Авторы выражают благодарность М.В. Ефимовой за помощь в проведении ряда экспериментов.

Литература

1. Карначук Р.А. Регуляторное влияние зеленого света на рост и фотосинтез листьев // Физиология растений. 1987. Т. 34, вып. 4. С. 765–773.
2. Карначук Р.А., Постовалова В.М., Беленькая Е.В., Жуланова С.Г. Фитохромный контроль метаболизма ^{14}C -углеводов в растениях // Физиология растений. 1978. Т. 25. С. 268–271.
3. Головацкая И.Ф. Роль криптохрома 1 и фитохромов в регуляции фотоморфогенетических реакций растений на зеленом свете // Физиология растений. 2005. Т. 52. С. 822–829.
4. Головацкая И.Ф., Карначук Р.А., Ефимова М.В. и др. Роль криптохрома 1 и фитохромов А–Е в регуляции роста арабидопсиса на зеленом свете // Вестник Томского государственного университета. 2007. № 297. С. 184–187.
5. Карначук Р.А., Негрецкий В.А., Головацкая И.Ф. Гормональный баланс листа растений на свете разного спектрального состава // Физиология растений. 1990. Т. 37, вып. 3. С. 527–534.
6. Карначук Р.А., Головацкая И.Ф. Гормональный статус, рост и фотосинтез растений, выращенных на свете разного спектрального состава // Физиология растений. 1998. Т. 45, вып. 6. С. 925–934.
7. Chory J., Reinecke D., Sim S. et al. A role for cytokinins in de-etiolation in *Arabidopsis*: *det* mutants have an altered response to cytokinins // Plant Physiol. 1994. Vol. 104. P. 339–347.
8. Neff M., Nguyen S.M., Malancharuvil E.J. et al. BAS1: A gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in *Arabidopsis* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 96. P. 15316–15323.
9. Хрипач В.А., Лахвич Ф.А., Жабинский В.Н. Брассиностероиды. Минск: Наука и техника, 1993. 287 с.
10. Прусакова Л.Д., Чижова С.И. Роль брассиностероидов в росте, устойчивости и продуктивности растений // Агрохимия. 1996. № 11. С. 137–150.
11. Clouse S.D., Sasse J.M. Brassinosteroids: Essential Regulators of Plant Growth and Development // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1998. Vol. 49. P. 427–451.
12. Головацкая И.Ф., Никонорова Н.М. Рост и продуктивность растений в зависимости от их чувствительности к свету и способа обработки брассинолидом // Агрохимия. 2008. № 1. С. 46–51.
13. Koorneef M., Rolff E., Spruit C.J.P. Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh // Z. Pflanzenphysiol. 1980. Vol. 100. P. 147–160.
14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15. P. 473–497.

15. Кудоярова Г.Р., Веселов С.Ю., Каравайко Н.Н. и др. Иммуноферментная система для определения цитокининов // Физиология растений. 1990. Т. 37. С. 193–199.
16. Chory J., Peto C., Feinbaum R., Pratt L., Ausubel F. *Arabidopsis thaliana* mutant that develops as a light-grown plant in the absence of light // Cell. 1989. Vol. 58. P. 991–999.
17. Clouse S.D., Langford M., Hall A.F. et al. Physiological and molecular effects of brassinosteroids on *Arabidopsis thaliana* // Plant Growth Regul. 1993. Vol. 12. P. 61–66.
18. Schumacher K., Chory J. Brassinosteroid signal transduction: still casting the actors // Curr. Opin. Plant Biol. 2000. Vol. 3. P. 79–84.
19. Карначук Р.А., Головацкая И.Ф., Ефимова М.В., Хрипач В.А. Действие эпибраassinолита на морфогенез и соотношение гормонов у проростков *Arabidopsis* на зеленом свете // Физиология растений. 2002. Т. 49. С. 591–595.
20. Briggs W.R. Red light, auxin relationships and the phototropic responses of corn and oat coleoptiles // Am. J. Bot. 1963. Vol. 50. P. 196–207.
21. Muir R.M., Zhu L. Effect of light in the control of growth by auxin and its inhibitor(s) in the sunflower // Physiol. Plant. 1983. Vol. 57. P. 407–410.
22. Clouse S.D. Integration of light and brassinosteroid signals in etiolated seedling growth // Trends Plant Sci. 2001. Vol. 6. P. 443–445.
23. Li J., Nagpal P., Vitart V. et al. A Role for brassinosteroids in light-dependent development in *Arabidopsis* // Science. 1996. Vol. 272. P. 398–401.

Поступила в редакцию 03.12.2009 г.

Irina F. Golovatskaya, Raisa A. Karnachuk

Biological Institute of Tomsk State University, Tomsk, Russia
E-mail: golovatskaya@mail.tomsknet.ru

THE EFFECT OF BRASSINOLIDE ON ARABIDOPSIS SEEDLINGS GROWTH AND HORMONAL BALANCE UNDER GREEN LIGHT

Summary. Studied the effects of brassinolide (BL) and green light (GL) on the content of endogenous phytohormones (IAA, cytokinins, and ABA) and morphogenesis of 7-day-old *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh seedlings of wild type (Col) and its *det2* mutant with disturbed synthesis of brassinosteroids. In darkness the mutant *det2* contained considerably less free IAA and both forms of ABA, but much more cytokinins (zeatin and zeatin riboside) and bound IAA, as compared to the wild-type seedlings. Level of free ABA and area of cotyledon increased under action of factors GL+BL. The conclusion is that green light and brassinolide signals interact in the control of the cotyledon growth in *A. thaliana* seedlings.

Key words: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.; photomorphogenesis; green light; brassinolide; IAA; zeatin; zeatin riboside; ABA.

Received December 03, 2009