ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ, 2002, том 49, № 4, с. 591–595

УДК 581.143:581.132

ДЕЙСТВИЕ ЭПИБРАССИНОЛИДА НА МОРФОГЕНЕЗ И СООТНОШЕНИЕ ГОРМОНОВ У ПРОРОСТКОВ *Arabidopsis* НА ЗЕЛЕНОМ СВЕТУ

© 2002 г. Р. А. Карначук, И. Ф. Головацкая, М. В. Ефимова, В. А. Хрипач*

Кафедра физиологии и биотехнологии растений Томского государственного университета, Томск
** Институт биоорганической химии Национальной академии наук Белоруссии, Минск*

Поступила в редакцию 26.09.2001 г.

Изучали влияние 24-эпибрассинолида (БЛ) на уровень эндогенных гормонов и фотоморфогенез проростков *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh дикого типа (Ler), а также мутанта *hy4*, у которого нарушен синтез криптохрома 1 (CRY1). Этот продукт гена *HY4* является фоторецептором синего света у дикого типа, но чувствителен и к зеленому свету. У 7-дневных проростков *hy4* соотношение АБК и зеатина в темноте отличалось от такового у Ler. У мутанта было значительно снижено содержание зеатина и увеличено содержание свободной АБК, что могло быть причиной замедления роста гипокотиля *hy4* в темноте. БЛ в темноте тормозил рост гипокотилей и увеличивал площадь семядолей у *hy4* сильнее, чем у Ler. Зеленый свет не влиял на рост гипокотиля *hy4*, но увеличивал площадь семядолей, что может быть сопряжено у *hy4* со слабым повышением содержания свободной ИУК и заметным уменьшением свободной АБК, а также падением уровня цитокининов в проростках. Ответная реакция семядолей *hy4* на зеленый свет, вероятно, связана с работой других фоторецепторов, отличных от CRY1. Действие БЛ на морфогенез проростков усиливалось на зеленом свету, как у Ler, так и у *hy4*, что также было сопряжено с изменением соотношения эндогенных ИУК, АБК и цитокининов. Можно предположить, что БЛ участвует в фотоморфогенезе и взаимодействует с эндогенными гормонами, передающими световой сигнал, поглощенный фоторецепторами зеленого света.

Arabidopsis thaliana – мутанты – криптохром – эпибрассинолид – зеленый свет – фитогормоны – морфогенез

Брассиностероиды широко распространены во всем растительном царстве и проявляют биологическую активность, увеличивая урожай, уменьшая опадение плодов, повышая устойчивость к болезням и стрессу [1]. У *Arabidopsis thaliana* были изолированы четыре гена, контролирующие уровень брассиностероидов, и все мутации по этим генам проявляли характерный карликовый фенотип, который не удавалось устранить другими гормонами [2]. Ген *Arabidopsis DET2* кодирует белок, который имеет значительное сходство с животными стероид-5-α-редуктазами. Мутации, меняющие экспрессию *DET2 in vivo*, ведут к нарушениям светозависимого развития растений [3], которые можно компенсировать добавлением растительного стероида – брассинолида.

Возможно, такой эффект брассинолида связан с регуляцией им уровня других эндогенных гормонов, контролирующих рост и развитие растений на свету. Показано, что красный и синий свет регулируют фотоморфогенез растений, изменяя при этом их гормональный статус [4, 5]. Зеленый свет в отношении регуляции морфогенеза мало изучен [6] и этот диапазон ФАР продолжают считать неактивным.

Цель данной работы – оценить влияние 24-эпибрассинолида на фотоморфогенез и соотношение эндогенных гормонов у проростков *A. thaliana* в связи с трансдукцией сигнала зеленого света.

МЕТОДИКА

В работе использовали две линии *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh экотипа Landsberg *erecta*: дикий тип (Ler) и мутант *hy4*, описанный Koornneef с соавт. [7]. Мутант *hy4* с нарушенным синтезом фоторецептора синего света криптохрома 1 (CRY1) [8, 9] проявляет пониженную чувствительность к продолжительному облучению синим светом и УФ-А. CRY1 в определенной степени также чувствителен к зеленому свету [10].

Сокращения: БЛ – 24-эпибрассинолид; CRY – криптохром.

Адрес для корреспонденции: Карначук Раиса Александровна. 634050 Томск, пр. Ленина, 36, Томский госуниверситет, кафедра физиологии и биотехнологии растений. Электронная почта: karnach@ic.tsu.ru

Влияние БЛ на рост 7-дневных проростков *Arabidopsis* в темноте и при ежедневном 60-минутном досвечивании зеленым светом

Условия выращивания	Длина гипокотиля, мм		Площадь семядоли, мкм^2 × 10^3	
	Ler	*hy4*	Ler	*hy4*
Темнота	11.9 ± 0.10	8.5 ± 0.13	165 ± 3	148 ± 2
Темнота + БЛ	10.2 ± 0.08	6.2 ± 0.17	187 ± 5	181 ± 3
Темнота + Зеленый свет	8.8 ± 0.17	8.5 ± 0.14	189 ± 4	185 ± 4
Темнота + Зеленый свет + БЛ	7.7 ± 0.20	6.0 ± 0.10	235 ± 8	269 ± 7

Семена обрабатывали 3%-ной H_2O_2 в 80%-ном этаноле, после чего помещали в чашки Петри на жидкую питательную среду, содержащую соли по МС и 24-эпибрассинолид (БЛ) в концентрации 10^{-6} М, и выдерживали в течение 3 сут при 6°С. В контроле использовали среду без добавления БЛ. Для стимуляции прорастания семена освещали 16 ч люминесцентными лампами ЛД-40 (интенсивностью 33 Вт/м^2), после чего экспонировали 7 сут в темноте или с ежедневным досвечиванием зеленым светом по 60 мин. Зеленый свет выделяли с помощью интерференционного светофильтра от галогеновой лампы. Диапазон излучения с максимумом 543 нм и шириной полосы 20 нм имел плотность потока квантов 3.7 мкмоль/(м^2 с).

Длину гипокотилей измеряли под лупой БМ-51-2 (увеличение 8.75×), а площадь семядолей – под микроскопом МикМед-1 ВАР.1 с помощью винтового окулярного микрометра МОВ-1-15× (увеличение 150×) ("ЛОМО", Россия). Для каждого варианта использовали сто проростков.

Выделение свободной и связанной форм ИУК и АБК проводили по методу, включающему экстракцию горячим 70%-ным этанолом, упаривание экстракта до водного остатка и экстрагирование последнего при pH 2.7–3.0 диэтиловым эфиром [11]. Для получения связанных форм ИУК и АБК водный остаток подвергали щелочному гидролизу и повторно экстрагировали его диэтиловым эфиром при pH 2.7–3.0. Разделение фитогормонов проводили с помощью ТСХ на пластинках Silufol UV-254 ("Kavalier", Чехия) в системе растворителей этилацетат : хлороформ : уксусная кислота (100 : 100 : 1, по объему). Для идентификации использовали стандартные образцы ИУК ("Serva", Германия) и АБК ("Sigma", США).

Выделение свободных цитокининов проводили по методу, предусматривающему экстракцию растительного материала 70%-ным этанолом, упаривание до водного остатка и последующую экстракцию (*n*-)бутанолом при pH 8.0 [12]. Разделение цитокининов осуществляли на пластинках Silufol UV-254 в дистиллированной воде. В качестве стандартов использовали зеатин и зеатинрибозид ("Sigma").

Количественное определение фитогормонов проводили с помощью твердофазного иммуноферментного метода [13, 14]. Для определения использовали реактивы от "Фармхиминвеста" (Россия).

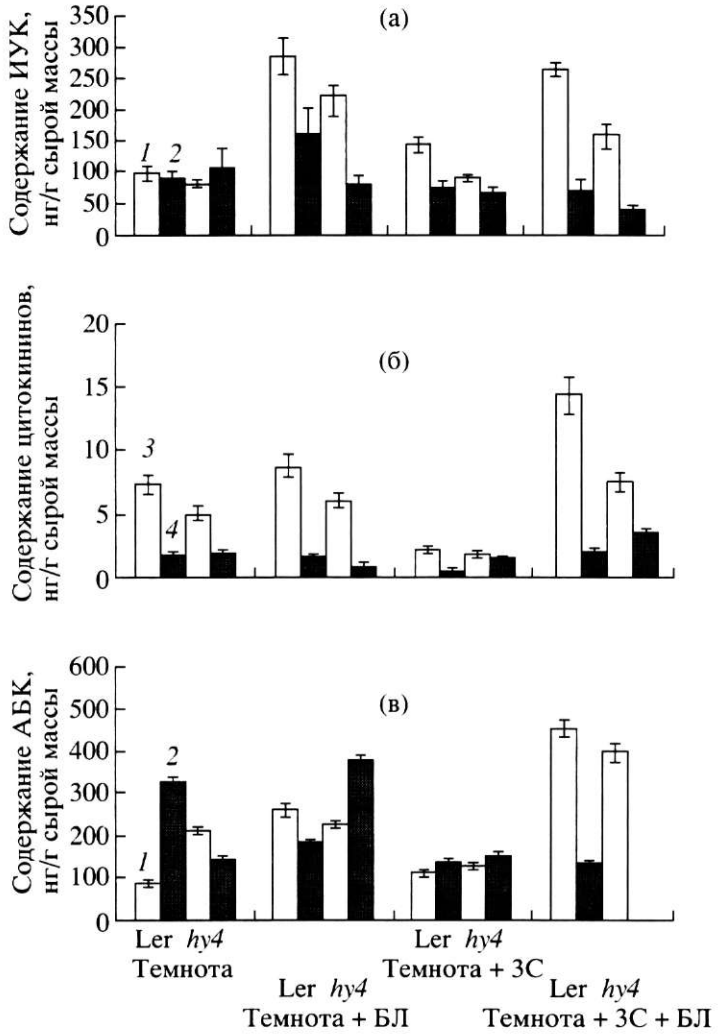
В таблице и на графиках приведены средние арифметические из двух независимых экспериментов, каждый из которых проведен в 3 биологических повторностях (n = 6), и их стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфометрические исследования 7-дневных проростков *A. thaliana*, выросших в темноте, показали, что длина гипокотилей и площадь семядолей у мутанта *hy4* были достоверно меньше, чем у дикого типа (таблица). Это согласуется с описанными показателями роста *hy4* [9, 15]. Мутант дефектен по CRY1, у него нарушен синтез рецептора синего света – CRY1, который также чувствителен и к зеленому свету [16]. В темноте его проростки должны были мало отличаться от дикого типа Ler. Однако, судя по данным таблицы, они значительно короче. Вероятно, у мутанта *hy4* имеются дополнительные мутации, тесно связанные с нарушением гена CRY1 и отвечающие за удлинение гипокотиля в темноте.

Добавление БЛ в темноте незначительно (на 14%) снижало прирост в длину гипокотиля у Ler, тогда как у *hy4* это уменьшение составило 27% (таблица). Темновые проростки, обработанные БЛ, имели черты растений, находящихся на свету. При обработке БЛ растений *A. thaliana*, росших 11 сут в темноте, другие авторы также наблюдали торможение роста гипокотиля [15, 17]. Площадь семядолей мутанта на БЛ увеличивалась заметнее, чем у Ler. Можно предполагать, что у семядолей *hy4* экзогенный гормон компенсировал дефицит эндогенного БЛ.

Зеленый свет данной интенсивности тормозил рост гипокотиля проростков дикого типа по сравнению с полной темнотой и не влиял на рост у *hy4*, тогда как площадь семядолей у обеих форм возрастала, причем в большей степени у мутанта. Есть основания говорить о чувствительности к



Влияние БЛ на содержание свободной и связанной форм ИУК (а), цитокининов (зеатина и зеатинрибозида) (б) и свободной и связанной АБК (в) в 7-дневных проростках *Arabidopsis*, выращенных в темноте или при ежедневном 60-минутном досвечивании зеленым светом (ЗС).

1 – свободная форма, *2* – связанная форма, *3* – зеатин, *4* – зеатинрибозид.

зеленому свету проростков дикого типа и предположить, что эти проростки имеют фоторецепторы зеленого света, в том числе CRY1. У мутантов *hy4* с нарушенным синтезом CRY1 сохранилась ответная реакция на зеленый свет в семядолях.

Из *Arabidopsis* выделены два гена, – CRY1 и CRY2, – каждый из которых кодирует белок, имеющий большое сходство N-концевой части с хромофоросвязывающей областью микробных ДНК-фотолиаз первого типа. Эти флавиновые ферменты катализируют зависимое от синего света восстановление в ДНК пиримидиновых димеров циклобутанового типа. Криптохромы 1 (CRY1) и 2 (CRY2) отличаются по последовательности их С-концевого участка. Фотолиазы обычно содержат два хромофора, поглощающих синий свет, птеринметенилтетрагидрофолат, или деазофлавин, и восстановленный ФАД·H_2 [9]. Апопротеин CRY1, экспрессированный *Escherichia coli*, связывает и метенилтетрагидрофолат, и ФАД, но не имеет фотолиазной активности. ФАД при этом стабильно связан в виде полувосстановленного флавина (флавосемихинона), поглощающего зеленый свет [16]. Тем самым можно объяснить некоторую чувствительность к зеленому свету проростков Ler с ненарушенным CRY1. У проростков *hy4*, по всей видимости, функционирует другой фоторецептор зеленого света, контролирующий рост семядолей, но не растяжение гипокотиля.

Добавление БЛ при экспозиции на зеленом свету привело к увеличению размеров семядолей у Ler (на 24%) и *hy4* (на 45 %) по сравнению с контролем (зеленый свет без БЛ). Однако для роста гипокотиля усиление ингибиторного действия БЛ и зеленым светом показано только для проростков Ler. По всей видимости, фоторецепторы зеленого света контролируют не одну функцию. На-

пример, показано, что фоторецептор CRY1 участвует в восприятии растениями *Arabidopsis* длины дня. Мутанты, недостаточные по фоторецептору CRY1, проявляют нормальные фототропические реакции. Вместе с тем некоторые аллели мутанта *nph1* лишены фототропизма, так как у них нарушен другой фоторецептор NPH1, контролирующий фототропизм через синий свет [18]. На существование иных фоторецепторов зеленого света указывали данные, полученные при исследовании никтинастических движений листьев альбиции [19]. Автор пришел к заключению, что существует пигмент, поглощающий зеленый свет – гелиохром, который взаимодействует как с криптохромом, так и с фитохромом.

Различные ответные реакции растущих гипокотилей у Ler и *hy4* на БЛ и зеленый свет сопровождались различиями в гормональном статусе проростков. У мутанта содержание свободной и связанной ИУК в темноте было таким же, как у проростков дикого типа (рис. 1а). Добавление БЛ в темноте в несколько раз увеличивало уровень свободной формы ауксина у проростков дикого типа и мутанта, особенно значительно в проростках Ler, у которых также возрастало содержание связанной формы ИУК. Однако увеличение содержания ауксина под действием БЛ не способствовало удлинению гипокотилей, хотя известно, что приток ИУК необходим для удлинения гипокотилей *Arabidopsis* на свету, но не в темноте [20]. По-видимому, ауксин не важен для удлинения гипокотилей *Arabidopsis* в ходе темнового морфогенеза. Стимулирующее действие БЛ на уровень свободной ИУК сохранялось и на зеленом свету (рис. 1а), но аддитивного эффекта не наблюдалось. Содержание связанной ИУК в проростках Ler не менялось при совместном действии зеленого света и брассинолида, а у проростков *hy4* было достоверно ниже по сравнению с вариантом на зеленом свету.

Причиной, определяющей более слабый рост проростков и меньшую площадь семядолей *hy4* в темноте, может быть пониженное содержание зеатина по сравнению с Ler (рис. 1б). БЛ несколько повышал уровень зеатина у растений Ler и *hy4*, по-видимому, за счет некоторого понижения содержания зеатинрибозида. Действие зеленого света проявилось в снижении содержания зеатина, как у Ler, так и *hy4*, по сравнению с темновым вариантом. При совместном влиянии зеленого света и БЛ наблюдали самое заметное повышение уровня цитокининов, что, возможно, приводит к увеличению площади семядолей у Ler и *hy4* (таблица). Поскольку в темноте БЛ слабо влиял на содержание зеатина и его рибозида, то сильный эффект совместно действующих факторов (зеленого света и БЛ) позволяет рассматривать это явление как восстановление у мутанта уровня цитокининов, свойственного дикому типу, вероятно, на уровне генома. Возможно участие стероидного гормона в трансдукции сигнала зеленого света, причем цитокинины включаются в цепь фоторегуляторных реакций. Ответственность за восприятие сигнала зеленого света несет в основном рецептор CRY1, судя по реакциям Ler, тогда как другие рецепторы, судя по реакции *hy4* (рис. 1б), участвуют в меньшей степени.

Более короткий гипокотиль у проростков *hy4* в темноте можно рассматривать как результат высокого уровня свободной АБК, в два раза превышающего ее содержание у Ler (рис. 1в). В проростках дикого типа этот гормон находится в основном в связанном состоянии. БЛ в темноте увеличивал у Ler уровень свободной формы АБК, вероятно, за счет перехода ее из связанного состояния. Для проростков *hy4* было характерно увеличение под влиянием БЛ содержания связанной АБК в 3.5 раза при неизменном уровне свободной. В том и другом случае это сопровождалось торможением роста гипокотилей (таблица). БЛ на зеленом свету многократно увеличивал уровень свободной АБК у проростков Ler и *hy4*, но торможение роста гипокотиля происходило только у Ler. У мутанта не наблюдалось суммирование эффектов двух факторов на рост гипокотиля, что согласуется с мнением о роли CRY1 в удлинении проростков [9]. Резкое возрастание уровня АБК в варианте "зеленый свет + БЛ" по сравнению с зеленым светом, (рис. 1в) сравнимое с возрастанием цитокининов, также указывает косвенно на участие БЛ в реакциях, связанных с действием зеленого света, поглощаемого другими фоторецепторами.

Таким образом, подавление роста гипокотиля и увеличение площади семядолей у Ler в темноте при добавлении БЛ указывает на участие последнего в регуляции морфогенеза *Arabidopsis*. Эта регуляция осуществляется посредством изменения соотношения уровней и форм эндогенных гормонов (ИУК, АБК и цитокининов). Также очевидно специфическое действие стероидного гормона на фотоморфогенез проростков на зеленом свету. Полученные результаты показывают, что 24-эпибрассинолид участвует в светоуправляемом росте *Arabidopsis*, и его действие связано с изменением статуса эндогенных гормонов, включая ИУК, АБК, зеатин и его рибозид.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Khripach V.A., Zhabiuskii V.N., Ae de Groot* Brassinosteroids: A New Class of Plant Hormones. San Diego: Acad. Press, 1999. 456 p.
2. *Altmann T.* Recent Advances in Brassinosteroid Molecular Genetics // Curr. Opin. Plant Biol. 1998. V. 1. P. 378–383.
3. *Li J., Nagpal P., Vitart V., McNorris T.O., Chory J.* A Role for Brassinosteroids in Light-Dependent Devel-

opment in *Arabidopsis* // Science. 1996. V. 272. P. 398–401.

4. *Карначук Р.А., Негрецкий В.А., Головацкая И.Ф.* Гормональный баланс листа растений на свету разного спектрального состава // Физиология растений. 1990. Т. 37. С. 527–534.
5. *Mohr H., Schopfer P.* Plant Physiology. Berlin: Springer, 1995. 629 p.
6. *Карначук Р.А.* Регуляторное влияние зеленого света на рост и фотосинтез листьев // Физиология растений. 1987. Т. 34. С. 765–771.
7. *Koornneef M., Rolff E., Spruit C.J.P.* Genetic Control of Light-Inhibited Hypocotyl Elongation in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh // Z. Pflanzenphysiol. 1980. V. 100. P. 147–160.
8. *Ahmad M., Cashmore A.R. HY4* Gene of *A. thaliana* Encodes a Protein with Characteristics of a Blue-Light Photoreceptor // Nature. 1993. V. 366. P. 162–166.
9. *Jackson J.A., Jenkins G.I.* Extension-Growth Responses and Expression of Flavonoid Biosynthesis Genes in the *Arabidopsis hy4* Mutant // Planta. 1995. V. 197. P. 233–239.
10. *Whitelam G.C., Devlin P.F.* Light Signalling in *Arabidopsis* // Plant Physiol. Biochem. 1998. V. 36. P. 125–133
11. *Кефели В.И., Турецкая Р.Х., Коф Э.М., Власов П.В.* Определение биологической активности свободных ауксинов и ингибиторов роста в растительном материале // Методы определения фитогормонов, ингибиторов роста, дефолиантов и гербицидов / Под ред. Ракитина Ю.В. М.: Наука, 1973. С. 7–22.
12. *Негрецкий В.А.* Методические рекомендации по определению цитокининов // Методические рекомендации по определению фитогормонов. Киев: Ин-т ботаники АН УкрССР, 1988. С. 31–41.
13. *Кудоярова Г.Р., Веселов С.Ю., Каравайко Н.Н., Гюли-Заде В.З., Чередова Е.П., Мустафина А.Р., Мошков И.Е., Кулаева О.Н.* Иммуноферментная система для определения цитокининов // Физиология растений. 1990. Т. 37. С. 193–199.
14. *Холодарь В.А., Шевцов С.В., Чекуров В.М.* Применение иммуноферментного анализа для изучения фоторегуляции уровня гиббереллинов в этиопластах пшеницы // Физиология растений. 1995. Т. 42. С. 647–651.
15. *Карначук Р. А., Тищенко С. Ю, Головацкая И. Ф.* Эндогенные фитогормоны и регуляция морфогенеза *Arabidopsis thaliana* синим светом // Физиология растений. 2001. Т. 48. С. 262–267.
16. *Lin C., Robertson D.E., Ahmad M., Raibecas A.A., Jorns M.S., Dutton P.L., Cashmore A.R.* Association of the Flavin Adenine-Dinucleotide with the *Arabidopsis* Blue Light Receptor CRY1 // Science. 1995. V. 269. P. 968–970.
17. *Kaufmann A., Jessop A., Koncz C., Szekeres M., Willmitzer L., Altmann T.* Genetic Evidence for an Essential Role of Brassinosteroids in Plant Development // Plant J. 1996. V. 9. P. 701–713.
18. *Liscum E., Briggs W.R.* Mutations in the NPH1 Locus of *Arabidopsis* Disrupt the Perception of Phototrophic Stimuli // Plant Cell. 1995. V. 7. P. 473–485.
19. *Tanada T.* Interaction of Green or Red Light with Blue Light on the Dark Closure *Albizzia pinnules* // Physiol. Plant. 1984. V. 61. P. 35–37.
20. *Jensen P.J., Hangarter R.P., Estelle M.* Auxin Transport is Required for Hypocotyls in Light-Grown but not Dark-Grown *Arabidopsis* // Plant Physiol. 1998. V. 116. P. 455–462.