

---

## ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ БРАССИНОЛИДА В СВЕТОВОМ РАЗВИТИИ ПРОРОСТКОВ *ARABIDOPSIS THALIANA*\*

М.В. Ефимова

Кафедра физиологии растений и биотехнологии  
Томский государственный университет  
пр. Ленина, 36, Томск, Россия, 634050

Лаборатория экспрессии генома растений  
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН  
ул. Ботаническая, 35, Москва, Россия, 127276

В статье рассказывается о проведении исследований регуляторной роли наиболее активного представителя семейства brassinosterоидов — brassинолида — в развитии проростков в темноте. Изучены ростовые показатели и состав фотосинтетических пигментов проростков в зависимости от условий освещения. В качестве объекта исследований были выбраны растения арабидопсиса — *Arabidopsis thaliana*, отличающиеся по эндогенному уровню brassинosterоидов — родительская линия экотипа Columbia и его мутант *det2* с нарушенным синтезом brassинолида. Отмечена зависимость ростовых показателей проростков от концентрации brassинолида. Показана физиологическая активность зеленого света, наряду с синим, в регуляции развития растений *A. thaliana* на начальных этапах онтогенеза. Высказано предположение о тесной связи между выбором определенной программы развития растений — скотоморфогенезом или фотоморфогенезом — и эндогенным уровнем brassинosterоидов.

**Ключевые слова:** *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh), brassинosterоиды, brassинолид, фотоморфогенез, скотоморфогенез, фотосинтетические пигменты, синий свет, зеленый свет.

Развитие растений на начальных этапах онтогенеза в зависимости от влияния внутренних и внешних факторов может идти по двум программам — темнового (скотоморфогенез) или светового развития (фотоморфогенез). Свет, как внешний фактор, не только запускает фотосинтетические реакции, но и регулирует рост и развитие растений в зависимости от интенсивности и спектрального состава. Начальные признаки активации светового развития проростков — укорочение осевых органов, увеличение размеров семядолей и синтез фотосинтетических пигментов. В то же самое время в управление фотоморфогенезом могут быть включены эндогенные регуляторы — фитогормоны. Фитогормоны могут выступать или в качестве вторичных посредников между регуляторным пигментом (фоторецептором) и определенным физиологическим ответом, или самостоятельно запускать реакции фотоморфогенеза в темноте [1—5]. Особое место в ходе этого процесса отводится сравнительно новому классу фитогормонов — brassинosterоидам (БС). Физиологическая роль БС проявляется при очень низких их концентрациях. Основные сферы применения БС в сельском хозяйстве — стимуляция роста и развития растений, повышение их продуктивности и устойчивости к неблагоприятным факторам внешней среды. Положительное влияние brassинosterоидов на рост и развитие, скорее всего, связано со способностью изменять гормональный баланс

---

\* Работа выполнена при частичной финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг. (мероприятие 1.3.1) (Государственный контракт № П 1369 от 2 сентября 2009 г.) и РФФИ.

растений [4]. В свою очередь, эндогенный уровень brassinosterоидов и чувствительность к ним растений находятся под непосредственным контролем фоторецепторов красного и синего света — фито- и криптохромов [5; 6]. В связи с тем что многие исследователи рассматривают зеленую область спектра в качестве неактивного участка ФАР [2; 7], ее роль в реализации регуляторной функции brassinosterоидов не изучали.

Чтобы оценить роль brassinosterоидов (брассинолида) в темновом развитии растений и значение brassinosterоидов в формировании ответной реакции растений на синий и зеленый свет, мы изучали влияние различных концентраций брассинолида на морфогенез этиолированных проростков и селективного света на морфогенез и пигментный состав проростков *Arabidopsis thaliana*, отличающихся по эндогенному уровню brassinosterоидов.

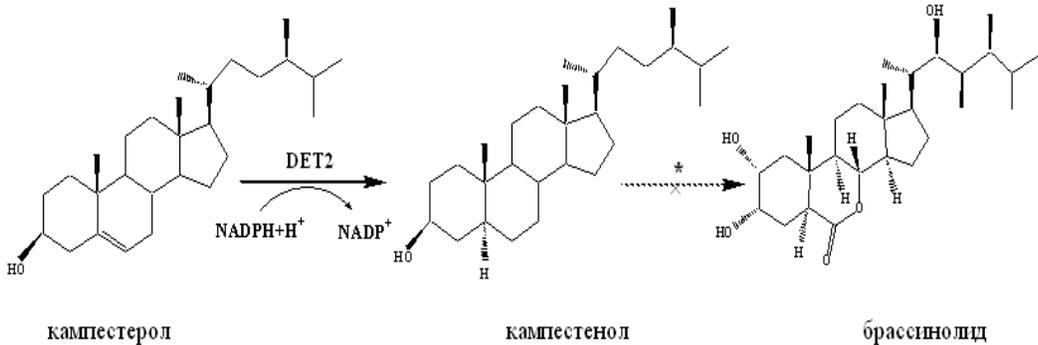
**Объект и методики исследования.** Работа выполнена на модельном растении *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (сем. крестоцветные) экотипа Columbia и его мутанта (det2) с нарушениями светового развития за счет недостаточного синтеза brassinosterоидов. Семена *A. thaliana* стерилизовали 3%-й  $H_2O_2$  и высевали в чашки Петри на модифицированную жидкую среду Мурасиге-Скуга (MS) с половинным составом солей. Для стимуляции и синхронизации прорастания семена арабидопсиса выдерживали в течение 3 дней при температуре 4—6 °С и предосвещали белым светом (люминесцентные лампы ЛД-40, 3 часа, 3700 люкс). После чего семена проращивали на постоянном синем или зеленом свету (цветные лампы фирмы «Philips»,  $\lambda_{max} = 460$  нм или 545 нм; плотность потока падающих квантов составляла  $160 \text{ мкмоль/м}^2 \cdot \text{с}$ ) при фотопериоде 16 ч/8 ч и температуре воздуха  $22 \pm 2$  °С. В качестве контроля использовали 7-дневные проростки, выращенные в темноте.

Для изучения влияния брассинолида на морфогенез проростков *Arabidopsis* в питательную среду  $1/2$  MS до стратификации семян добавляли разные концентрации брассинолида ( $10^{-12}$ — $10^{-6}$  М). Синтетический аналог brassinosterоидов (брассинолид) любезно предоставлен чл.-корр. НАН Беларуси В.А. Хрипачем (лаборатория химии стероидов Института биоорганической химии НАН Беларуси, Минск).

Для оценки уровня фотосинтетических пигментов определенное количество проростков растирали в 96% этаноле и центрифугировали (10 мин. при 8 тыс. об./мин., центрифуга многофункциональная Eppendorf 5804R). Оптическую плотность пробы определяли на спектрофотометре Shimadzu UV-1650. Концентрацию пигментов в спиртовой вытяжке рассчитывали согласно Н.К. Lichtenthaler [8].

Длину гипокотилей проростков *A. thaliana* измеряли под лупой БМ-51-2, а площадь семядолей — под микроскопом Micros MC 100 (Австрия) с помощью цифровой камеры Moticam 2000 (Испания) и программы Motic Images Plus 2.0. Для каждого варианта измеряли по 35—50 проростков в каждой из трех биологических повторностей. Результаты экспериментов представлены на рис. 2—4 как средние арифметические и их стандартные ошибки. Для сравнения независимых выборок, подчиняющихся закону нормального распределения, использовали параметрический критерий Стьюдента. Значения *t*-критерия находили для 95%-го уровня значимости ( $p < 0,05$ ).

**Результаты и обсуждение.** В настоящее время активно обсуждается, положительную или отрицательную роль выполняют brassиностероиды в световом развитии растений. Для исследования этой проблемы изучали ответную реакцию растений на экзогенный brassинолид и специфику ответной реакции проростков на селективный свет в зависимости от эндогенного уровня brassиностероидов. Нарушение гена DET2, кодирующего стероид-5 $\alpha$ -редуктазу (рис. 1), приводит к значительному уменьшению эндогенного уровня brassиностероидов в растениях *Arabidopsis* и позволяет анализировать реакцию проростков на экзогенные факторы в зависимости от содержания brassиностероидов.



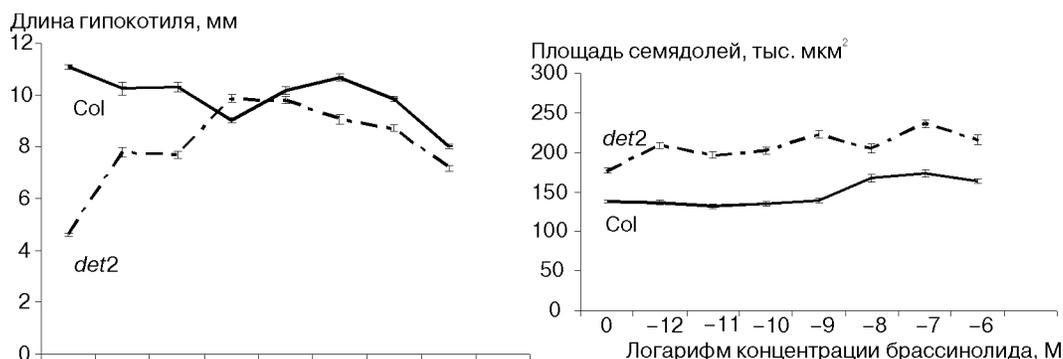
**Рис. 1.** Этап в биосинтезе brassиностероидов, контролируемый геном DET2

Проявление мутации заключалось в укорочении зародышевого стебля (гипокотиля), увеличении площади семядолей и повышении уровня фотосинтетических пигментов (хлорофилла b) в темноте относительно проростков экотипа Columbia (Col) с конститутивным уровнем brassиностероидов (рис. 2, 3). Это может свидетельствовать о том, что продукт гена DET2 может быть отрицательным регулятором светового развития проростков, так как его отсутствие вызывало проявление светового фенотипа проростков в условиях темноты. В соответствии с этим экзогенные brassиностероиды в темноте не могут запускать реакции фотоморфогенеза.

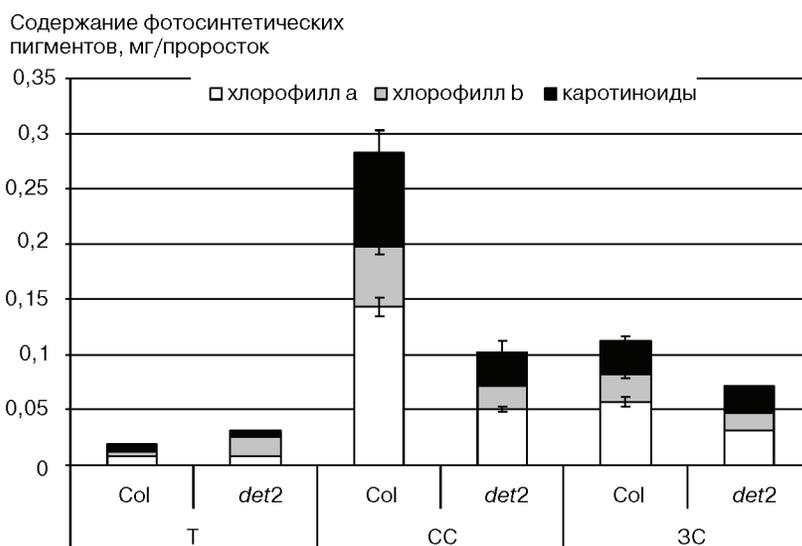
Однако результаты наших исследований отражают способность brassиностероидов индуцировать световое развитие в условиях темноты. Ранее было показано, что один из brassиностероидов — эпибрасинолид — способен вызывать не только синтез фотосинтетических пигментов, но и формирование светового фенотипа у проростков — укороченных гипокотилей и крупных семядолей [9; 10].

Экзогенный brassинолид в широком диапазоне концентраций вызывал аналогичные морфологические изменения проростков дикого типа Col (рис. 2). При этом укорочение гипокотилей наблюдалось под действием brassинолида в концентрации  $10^{-12}$ — $10^{-6}$  М, тогда как стимулирующее влияние на рост семядолей brassинолид оказывал при более высоких концентрациях —  $10^{-8}$ — $10^{-6}$  М. Фенотип проростков мутанта *det2* под влиянием экзогенного brassинолида в концентрации  $10^{-12}$ — $10^{-6}$  М частично восстанавливался до фенотипа проростков дикого типа. Нарушенное за счет недостаточного синтеза brassинолида удлинение клеток осевых органов восстанавливалось под действием экзогенного brassинолида, что про-

водило к удлинению гипокотилия (рис. 2) и корня (данные не показаны). Таким образом, можно предположить, что существует тесная связь между выбором определенной программы развития растений — скотоморфогенез (развитие в темноте) или фотоморфогенез — и эндогенным уровнем brassinosterоидов.



**Рис. 2.** Влияние брассинолида на морфогенез этилированных проростков *Arabidopsis thaliana*

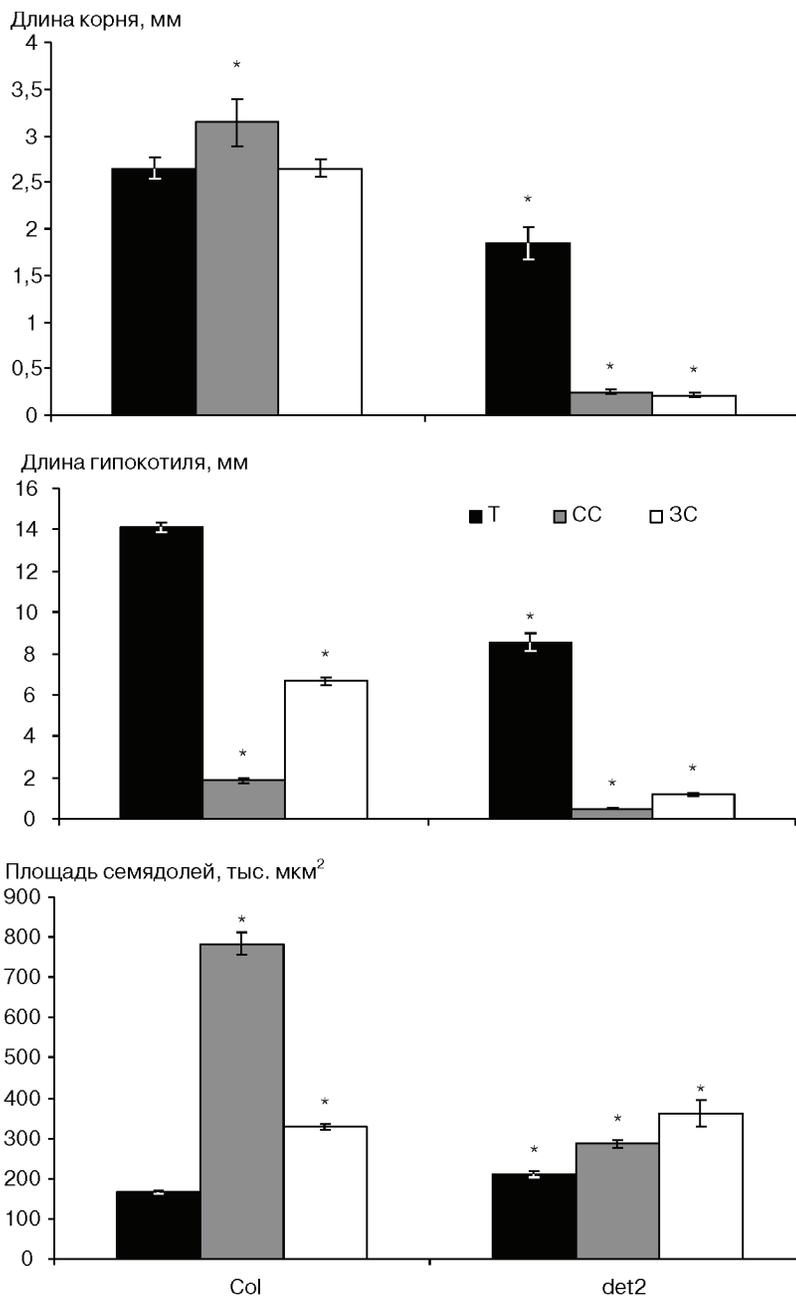


**Рис. 3.** Содержание фотосинтетических пигментов в проростках *Arabidopsis thaliana*, растущих в темноте (Т) и на селективном свете (СС — синий свет, ЗС — зеленый свет)

Для изучения роли brassinosterоидов в реализации световой программы растений в зависимости от качественного состава света (синяя или зеленая область спектра) и разновидности активируемого им фоторецептора мы оценивали ростовые показатели и пигментный состав растений, отличающихся по эндогенному уровню brassinosterоидов в зависимости от условий освещения. Контролем служили 7-суточные этилированные проростки.

Ежедневное освещение проростков *Arabidopsis* селективным светом запускало программу светового развития у проростков родительской линии Col и его мутанта det2 (рис. 4). Чувствительность проростков к свету зависела от эндогенного

уровня brassиностероидов и качественного состава света. Наибольшая ответная реакция у проростков с достаточным уровнем БС отмечена при ежедневном освещении синим светом. При этом длина гипокотилия на синем свету в сравнении с контролем уменьшалась в 7,5 раз, а площадь семядолей увеличивалась примерно в 5 раз (рис. 4). Аналогичные показатели на зеленом свету изменялись в два раза.



**Рис. 4.** Влияние селективного света на морфогенез проростков *Arabidopsis thaliana* экотипа Columbia (Col) и его мутанта с нарушенным синтезом brassинолида (det2):

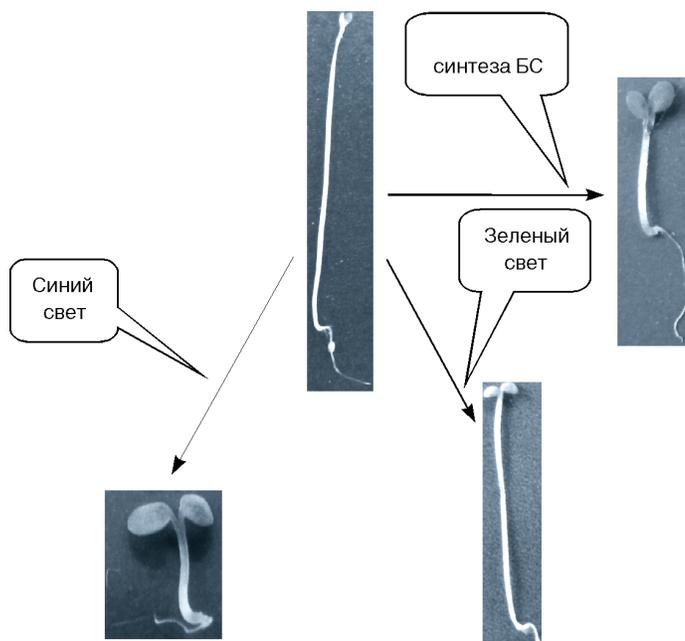
T — темнота (контроль), CC — синий свет, ЗС — зеленый свет;

\* — различия достоверны при  $p < 0,05$

Меньшая активность зеленого света в отношении гипокотилей и проростков арабидопсис может быть объяснена тем, что зеленый свет усиливает растяжение гипокотилей на начальных этапах развития, в то время как другие участки ФАР интенсивно подавляют рост осевых органов [11—19]. Уровень фотосинтетических пигментов на селективном свете значительно увеличивался (рис. 3). Наибольшая ответная реакция была достигнута также на синем свете, суммарный уровень хлорофиллов по сравнению с контролем (темнота) увеличивался в 16 раз (в основном за счет хлорофилла а) и каротиноидов — в 12,5 раз; на зеленом свете различия составляли 7 и 4,5 раз соответственно.

Ответная реакция осевых органов проростков арабидопсиса с пониженным уровнем brassinosterоидов на действие селективного света была более выраженной по сравнению с ответом родительской линии. Различия ростовых показателей для гипокотилей родительской и мутантной линий увеличивались с 1,5 раз в темноте до 3,7 на синем и 5,8 раз на зеленом свете (рис. 4). При этом наблюдалось значительное подавление роста корневой системы — примерно в 8 раз по сравнению с реакцией проростков родительской линии. Изменения площади семядолей были незначительными, наибольшее увеличение размеров семядолей отмечено у проростков, постоянно растущих на зеленом свете. Отмечено снижение чувствительности фотосинтетических частей проростков к действию селективного света. Ответная реакция пигментной системы мутантных проростков в сравнении с диким типом также ослаблена, причем в значительной степени на синем свете (рис. 3).

На основании сходной реакции пигментной системы проростков, отличающихся по эндогенному уровню brassinosterоидов, на зеленый свет, можно предположить, что для реализации программы светового развития, инициированного зеленым светом, brassinosterоиды являются альтернативными посредниками.



**Рис. 5.** Модель активации программы фотоморфогенеза у этиолированных проростков *Arabidopsis thaliana*

Таким образом, нами показана физиологическая активность зеленого света наряду с синим в регуляции морфогенеза и пигментного состава проростков *Arabidopsis thaliana*. На основании полученных результатов по действию селективного света на морфогенез проростков *Arabidopsis* и инициации светового развития у проростков *det2* в темноте можно предположить наличие связи между выбором определенной программы развития растений — скотоморфогенез или фотоморфогенез — и эндогенным уровнем brassиностероидов (рис. 5). В свою очередь, реализация регуляторной роли brassиностероидов зависит от селективного состава света.

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] Li J., Nagpal P., Vitart V., McNorris T.O., Chory J. A role for brassinosteroids in light-dependent development in Arabidopsis // Science. — 1996. — Vol. 272. — P. 398—401.
- [2] Chory J., Reinecke D., Tim S., Wasburn T., Brenner M. A role for cytokinins in de-etiolation in Arabidopsis // Plant Physiol. — 1994. — Vol. 104. — P. 339—347.
- [3] Kravtsov A.K., Zubo Y.O., Yamburenko M.V., Kulaeva O.N., Kusnetsov V.V. Cytokinin and abscisic acid control plastid gene transcription during barley seedling de-etiolation // Plant Growth Regulation. — 2011. — DOI 10.1007/s10725-010-9553-y.
- [4] Khripach V.A., Zhabinskii V.N., Karnachuk R.A. Chemical probes in biology / Science at the interface of brassinosteroids: a new role of steroids as biosignaling molecules. — 2003. — M.P. Schneider. Ed. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. — Vol. 129. — P. 153—167 (NATO Science Series).
- [5] Neff M.M., Nguyen S.M., Malancharuvil E.J., Fujioka S., Noguchi T., Seto H., Tsubuki M., Honda T., Takatsuto S., Yoshida S., Chory J. BAS1: a gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in Arabidopsis // PNAS. — 1999. — Vol. 96. — P. 15316—15323.
- [6] Symons G.M., Reid J.B. Brassinosteroids do not undergo long-distance transport in pea. Implications for the regulation of endogenous brassinosteroid levels // Plant Physiol. — 2004. — Vol. 135. — P. 2196—2206.
- [7] Pédrón J., Agnes C., Simond-Côte E., Costa C., Lobstein E., Kraepiel Y. Polar auxin transport is required for the inhibition by blue light of the elongation-related LeXT tomato gene // Plant Growth Regulation. — 2004. — Vol. 42. — P. 113—123.
- [8] Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // Methods in Enzymology. — 1987. — № 148. — P. 350—382.
- [9] Ефимова М.В., Елисеева М.А. Регуляция эпибрасинолидом морфогенеза и содержания фотосинтетических пигментов в проростках *Arabidopsis thaliana* (L.) // Труды Томского государственного университета. Серия биологическая. — 2010. — Т. 275. — С. 267—271.
- [10] Карначук Р.А., Головацкая И.Ф., Ефимова М.В., Хрипач В.А. Действие 24-эпибрасинолида на морфогенез и соотношение гормонов у проростков *Arabidopsis* на зеленом свету // Физиология растений. — 2002. — Т. 49. — № 4. — С. 591—595.
- [11] Карначук Р.А. Регуляторное влияние зеленого света на рост и фотосинтез листьев // Физиология растений. — 1987. — Т. 34. — № 4. — С. 765—773.
- [12] Folta K.M. Green light stimulates early stem elongation, antagonizing light-mediated growth inhibition // Plant Physiology. — 2004. — Vol. 135. — P. 1407—1416.
- [13] Dhingra A., Bies D.H., Lehner K.R., Folta K.M. Green light adjusts the plastid transcriptome during early photomorphogenic development // Plant Physiology. — 2006. — Vol. 142. — P. 1256—1266.
- [14] Folta K.M., Maruhnich S.A. Green light: a signal to slow down or stop // Journal of Experimental Botany. — 2007. — Vol. 58. — № 12. — P. 3099—3111.

- [15] *Ефимова М.В.* Роль света и брассиностероидов в регуляции морфогенеза *Arabidopsis thaliana* (L.) *Heynh*: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. — М., 2006.
- [16] *Минич А.С., Минич И.Б., Зеленчукова Н.С., Карначук Р.А., Головацкая И.Ф., Ефимова М.В., Райда В.С.* Роль красного люминесцентного излучения низкой интенсивности в регуляции морфогенеза и гормонального баланса *Arabidopsis thaliana* // Физиология растений. — 2006. — Т. 53. — № 6. — С. 863—868.
- [17] *Карначук Р.А., Большакова М.А., Ефимова М.В., Головацкая И.Ф.* Интеграция сигналов синего света и жасмоновой кислоты в морфогенезе *Arabidopsis thaliana* (L.) *Heynh* // Физиология растений. — 2008. — Т. 54. — № 5. — С. 665—670.
- [18] *Карначук Р.А., Гвоздева Е.С., Ефимова М.В.* Светорегуляция морфогенеза трансгенных растений табака *in vivo* и *in vitro* // Физиология растений. — 2008. — Т. 55. — Вып. 4. — С. 560—564.
- [19] *Ефимова М.В.* Физиологическая роль брассиностероидов в развитии проростков *Arabidopsis thaliana* L. (*Heynh*) на селективном свете // Вестник Томского государственного университета. Биология. — 2010. — № 4 (12). — С. 106—116.

## PHYSIOLOGICAL ROLE OF BRASSINOLIDE IN THE LIGHT DEVELOPMENT OF ARABIDOPSIS THALIANA SEEDLING

M.V. Efimova

Department of botany, plant physiology and agrobiotechnology  
Russian People's Friendship University  
*Miklukho-Maklaya str., 8/2, Moscow, Russia, 117198*

Timirjazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Science  
*Botanicheskaya str., 35, Moscow, Russia, 127276*

The regulatory role of more active brassinosteroids — brassinolide in seedling development in darkness was studied. The growth parameters and photosynthetic pigment content of *Arabidopsis thaliana* seedlings under differ light conditions were investigated. The plant model to study regulatory role of selective light and brassinosteroids are *Arabidopsis thaliana*. *A. thaliana* ecotype Columbia (Col) and *det2* mutant with disturbed synthesis of brassinolide were used. The plant grow parameters depending on the brassinolide concentration. Physiological activity of green light also blue light in the regulation of *Arabidopsis* seedling development was noted. The interaction between plant development program — skoto- or photomorphogenesis and endogenous level of brassinosteroids has been shown.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana* L. (*Heynh*), brassinosteroids, brassinolide, photomorphogenesis, skotomorphogenes, pigment content, blue light, green light.