



УДК 577.171.5

© 2011

В. С. Кравец, С. В. Кретинин, М. В. Деревянчук, С. В. Драч,  
Р. П. Литвиновская, В. А. Хрипач

## Влияние низких температур на уровень эндогенных брасиностероидов

*(Представлено академиком НАН Украины В. П. Кухарем)*

*Досліджено динаміку рівня ендогенних брасиностероїдів (БС) при адаптації рослин до дії низьких температур. Виявлено збільшення рівня типових ендогенних БС — 24-епі-брасиноїду, 28-гомобрасиноїду й брасиноїду в проростках кукурудзи (*Zea mays L.*) за умов дії низьких температур.*

Одним из интенсивно развивающихся направлений современной биологии является анализ регуляции живых систем на уровне формирования и взаимодействия сигнальных систем, среди которых особое место принадлежит исследованиям фитогормональной сигнализации, направленным на выяснение молекулярной организации рецепторов гормонов и сети сигнальных систем, задействованных в процесс реализации биологического действия природных и синтетических физиологически активных соединений.

Ключевое место в этих исследованиях принадлежит эндогенным брасиностероидам (БС). БС участвуют в регуляции процессов развития растений — прорастании семян, росте тканей, дифференциации клеток [1], — индуцируют адаптацию растений к ряду стрессов: температурному [2], солевому [3], биотическому [1]. Генетические подходы и конструирование трансгенных растений с модификациями компонентов сигналинга БС позволяют углубить представление об участии БС в регуляции отдельных веток метаболизма. [4]. Несмотря на заметные успехи в изучении БС, полной картины об их действиях в условиях стресса нет. Дальнейшие исследования выявляют новые мишени действия БС, которые влияют на их реализацию в регуляции метаболизма [5].

Целью наших экспериментальных исследований было определение количественных изменений эндогенных БС при действии низких температур на растения.

**Экспериментальная часть.** Использовались 3-суточные этиолированные проростки растений кукурузы (*Zea mays L.*). Для анализа уровня эндогенных БС при оптимальных и стрессовых условиях проростки переносили в темную климатическую камеру — 8 °С

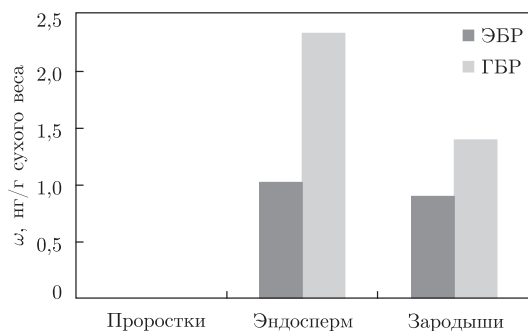


Рис. 1. Содержание brassinостероидов в разных тканях растений кукурузы *Zea mays* L. ЭБР — 24-эпибрасинолид, ГБР — 28-гомобрасинолид

и через различные промежутки времени проводили экстракцию БС из тканей и иммуноферментное определение их уровня. Экстракция осуществлялась в два этапа: первый — этилацетатом (3 раза по 100 мл) из водной вытяжки тканей растений (180 г ткани + 900 мл экстракц. раствора). Фазу с этилацетатом упаривали в вакууме и экстрагировали остаток циклогексаном (100 мл). Второй этап экстракции — смесью метанол : вода (4 : 1) (3 раза по 60 мл) из фазы с циклогексаном. Экстракт метанола упаривали в вакууме, остаток растворяли в небольшом количестве этилацетата. Последний упаривали под азотом и пробы анализировали иммуноферментным методом [6].

Для анализа методом ИФА в лунки планшета с иммобилизованными антителами вносили калибровочные пробы или исследуемые пробы (50 мкл) и рабочий раствор гаптена меченного пероксидазой хрена. Планшеты инкубировали при 37 °С, затем удаляли жидкость из лунок и промывали. Для проведения цветной реакции использовали раствор тетраметилбензидина в субстратном буфере. Реакцию останавливали при помощи стоп-реагента, после чего проводили измерение оптического поглощения на ИФА-ридере при длине волны 450 нм. Результаты анализа рассчитывали методом интерполяции по калибровочной кривой. Статистическая обработка указана по средним арифметическим трех повторностей с доверительными интервалами на уровне значимости 0,05.

**Результаты и их обсуждение.** Данные анализа свидетельствуют о разном уровне исследуемых гормонов в различных тканях растений. Самый низкий уровень 24-эпибрасинолида (ЭБР) отмечен в этиолированных проростках растений — 0,005 нг/г сухого веса, а самый высокий — в эндосперме и зародышах семян — 1,03 и 0,9 нг/г соответственно, что может свидетельствовать о ключевой роли БС в репродуктивной стадии развития растений (рис. 1). Уровень брасинолида (БР) в проростках также был 0,005 нг/г, тогда как в эндосперме и зародышах он составлял 2,35 и 1,4 нг/г соответственно. Действие низких температур (+8 °С) вызывает повышение уровня эндогенных БС в первые сутки адаптации (рис. 2). В этиолированных проростках кукурузы уровень 24-ЭБР возрастал с 0,005 до 0,082 нг/г сухого веса, 28-ГБР (гомобрасинолида) — с 0,005 до 0,385 нг/г, БР — с 0,005 до 0,0435 нг/г и лактонов — с 0,01 до 0,04 нг/г в первые трое суток адаптации. Высокие уровни БС в тканях оставались на протяжении семи суток эксперимента: 24-ЭБР — 0,143 нг/г, 28-ГБР — 0,53 нг/г, БР — 0,086 нг/г, лактоны — 0,09 нг/г, что свидетельствует об увеличении уровней БС в 28,6, 106, 17,2 и 9 раз соответственно (см. рис. 2).

Полученные нами результаты об увеличении уровня эндогенных БС свидетельствуют об их участии в ответе растений к действию низкотемпературного стресса. Определенный нами методом ИФА уровень БР в зародках и эндосперме кукурузы находится в тех же ин-

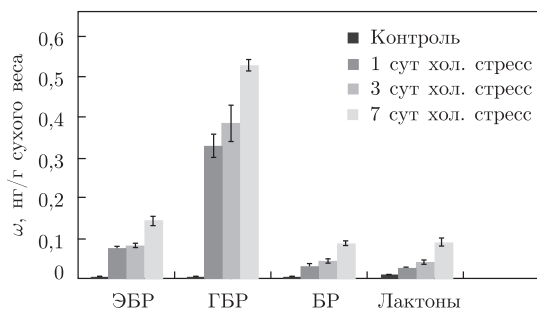


Рис. 2. Содержание 24-эпибрассинолида (ЭБР), 28-гомобрассинолида (ГБР), брассинолида (БР) и лактонов при действии низких температур

тервалах, что и в семенах арабидопсиса, анализированных методом газовой хроматографии и масс-спектрологии [7], в то время как уровень 24-ЭБР ниже уровня гормона в растениях арабидопсиса. Уровень БР в проростках кукурузы (см. рис. 1) при оптимальных условиях ниже уровня БР в растениях арабидопсиса — 0,005 нг/г сухого веса против 0,04 нг/г сырого веса [8]. Нами впервые был осуществлен анализ уровня 24-ЭБР в проростках, однако ранее результатов для таковых тканей растений арабидопсиса не было.

Наши данные об уровнях БС в проростках *Zea mays* L. соответствуют уровням эндогенных БР и других БС в растениях *Camellia sinensis* L. [9] и *Chlorella vulgaris* [10]. В трансгенных растениях риса (*Oryza sativa*) *brd2* (локус, кодирующий гомолог DIM/DWF1) со сниженным уровнем конвертации 24-метилхолестерола в кампестерол значительно снижены уровни всех полигидроксильных БС, включая катастерон, кастастерон и брассинолид [11]. Трансгенные растения с мутациями фермента 5- $\alpha$  редуктазы DET-2, катализирующий превращение прекурсора БС (24R)-24-метил-4-холестан-3-она и обеспечивающий пул субстрата для дальнейшего процесса 22-гидроксилирования, характеризуются повышенным содержанием (24R)-24-метил-4-холестан-3-она и, как результат, — значительно меньшими уровнями полигидроксилированных БС [12]. В модельной системе *Arabidopsis thaliana* ключевые гены, отвечающие за метаболизм БС, представлены классом ферментов-гидролаз — цитохромов P450 — BR6ox1, BR6ox2, CPD (23-гидролаза), DWF4 (22-гидролаза), ROT3, CYP90D, BAS1 (инактивирующая 26-гидролаза) [13], которые катализируют окисления карбоновых остатков предшественников БС с образованием биологически активных полигидроксильных БС. Уровень эндогенных БС связан с устойчивостью к абиотическим стрессам. Трансгенные *cpd* и *det2* растения арабидопсиса со сниженным эндогенным уровнем БС характеризуются гиперчувствительностью к действию абиотических стрессовых факторов [14].

Следовательно, наши данные свидетельствуют об участии БС в регуляции метаболизма клеток, обуславливая повышение холодоустойчивости растений. Вероятно, рост уровня эндогенных гормонов при действии низких температур связан с процессами регуляции метаболизма в ходе адаптации клеток растений к действию низких температур. Трансгенные растения *cpd* арабидопсиса со сниженным уровнем полигидроксильных БС экспрессируют пониженные уровни мРНК генов защиты к биотическим стрессам: PR1, PR2 и PR5. Индукция указанных генов возрастала при повышенной экспрессии гена *cpd*. Мутации в гене киназы *bin2-1*, обеспечивающая трансдукцию сигнала БС в ядре, также приводит к повышенной чувствительности к стрессам [14]. Трансгенные растения с мутациями в локусах *det2-1* и *bin2-1* более чувствительны к солевому стрессу и экспрессируют меньшие уровни COR78 и P5CS1 [14].

Важно отметить, что у трансгенных растений по сигналингу БС с “нокаутированным” геном рецептора *br1* значительно уменьшена экспрессия защитных генов при действии стрессовых факторов [15]. Таким образом, биосинтез эндогенных brassinosteroidов является необходимой частью клеточного ответа к действию низких температур и развития устойчивости.

Ранее нами было показано влияние низких температур и brassinosteroidов на активацию сигнальной трансдукции полифосфатидилинозитолов, что также может служить сигналом регуляции адаптационной перестройки метаболизма клетки. Развитие этих исследований способствует раскрытию ранних эффектов БС в клетке и механизмов стойкости к стрессам при их участии.

*Работа выполнена при поддержке Государственного фонда фундаментальных исследований Украины № 29.4/020-2009, № 41.4/041-2011 и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований № X07K-045.*

1. Nakashita H., Yasuda M., Nitta T. et al. Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice // *Plant J.* – 2003. – **33**, No 5. – P. 887–898.
2. Dhaubhadel S., Browning K. S., Gallie D. R., Krishna P. Brassinosteroid functions to protect the translational machinery and heat-shock protein synthesis following thermal stress // *Ibid.* – 2002. – **29**, No 6. – P. 681–691.
3. Kagale S., Divi U. K., Krochko J. E. et al. Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses // *Planta.* – 2007. – **225**, No 2. – P. 353–364.
4. Oki K., Inaba N., Kitano H. et al. Study of novel d1 alleles, defective mutants of the alpha subunit of heterotrimeric G-protein in rice // *Genes and Genet. Syst.* – 2009. – **84**, No 1. – P. 35–42.
5. Tang W., Deng Z., Wang Z.-Y. Proteomics shed light on the brassinosteroid signaling mechanisms // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2010. – **13**, No 1. – P. 27–33.
6. Хрипач В. А., Прядко А. Г. и др. Иммуноферментный анализ (24R) – brassinosteroidов // *Биоорганическая химия.* – 2007. – **33**, № 3. – P. 371–378.
7. Fujioka S., Noguchi T., Yokota T. et al. Brassinosteroids in *Arabidopsis thaliana* // *Phytochemistry.* – 1998. – **48**, No 4. – P. 595–599.
8. Bajguz A., Tretyn A. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants // *Ibid.* – 2003. – **62**, No 7. – P. 1027–1046.
9. Gupta D., Bhardwaj R., Nagar P. K., Kaur S. Isolation and Characterization of Brassinosteroids from Leaves of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze // *Plant Grow. Regul.* – 2004. – **43**, No 2. – P. 97–100.
10. Bajguz A. Isolation and characterization of brassinosteroids from algal cultures of *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Trebouxiophyceae) // *J. Plant Phys.* – 2009. – **166**, No 17. – P. 1946. – 1949.
11. Hong Z., Ueguchi-Tanaka M., Fujioka S. et al. The rice brassinosteroid-deficient dwarf2 mutant, defective in the rice homolog of *Arabidopsis* DIMINUTO/DWARF1, is rescued by the endogenously accumulated alternative bioactive brassinosteroid, dolichosterone // *Plant Cell.* – 2005. – **17**, No 8. – P. 2243–2254.
12. Fujioka S., Takatsuto S., Yoshida S. An early C-22 oxidation branch in the brassinosteroid biosynthetic pathway // *Plant Phys.* – 2002. – **130**, No 2. – P. 930–939.
13. Clouse S. Brassinosteroids // *Curr. Biol.: CB.* – 2001. – **11**, No 22. – P. 853–859.
14. Zeng H., Tang Q., Hua X. *Arabidopsis* Brassinosteroid Mutants *det2-1* and *bin2-1* Display Altered Salt Tolerance // *J. Plant Grow. Regul.* – 2010. – **29**, No 1. – P. 44–52.
15. Kim S. Y., Kim B. H., Lim C. J. et al. Constitutive activation of stress-inducible genes in a brassinosteroid-insensitive 1 (*br1*) mutant results in higher tolerance to cold // *Physiol. Plant.* – 2010. – **138**, No 2. – P. 191–204.

*Институт биоорганической химии  
и нефтехимии НАН Украины, Киев  
Институт биоорганической химии  
НАН Беларуси, Минск*

*Поступило в редакцию 09.02.2011*

V. S. Kravets, S. V. Kretinin, M. V. Derevyanchuk, S. V. Drach,  
R. P. Litvinovska, V. A. Khripach

### Effect of low temperatures on the level of endogenous brassinosteroids

*The present work demonstrates the results of investigation of quantitative changes in the endogenous brassinosteroids content during the plant adaptation to low temperatures. A higher level of typical endogenous brassinosteroids – 24-epibrassinolide, 28-homobrassinolide, and brassinolide – in the shoots of maize in response to the low temperature action is observed.*