

УДК 581.1

*Е. Б. ЯРОНСКАЯ, И. В. ВЕРШИЛОВСКАЯ, Н. Г. АВЕРИНА***СОДЕРЖАНИЕ ЗЕАТИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ  
В ПРОРОСТКАХ ЯЧМЕНЯ (*HORDEUM VULGARE L.*)  
С ПОВЫШЕННЫМ УРОВНЕМ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ***Институт фотобиологии НАН Беларуси, Минск**(Поступила в редакцию 18.03.2004)*

5-аминолевулиновая кислота (АЛК) является предшественником всех циклических (хлорофиллов, гемов, корриноидов) и линейных (билинов, фикобилинов) тетрапирролов, которые играют центральную роль в метаболизме растительных, животных и бактериальных организмов [1]. АЛК представляет собой естественный метаболит, концентрация которого в растениях *in vivo* поддерживается на низком уровне. В растениях, обработанных АЛК в концентрациях выше 10 мМ, она проявляет гербицидные свойства [2]. В таких растениях в ходе темновой инкубации на экзогенной АЛК происходит накопление порфириновых предшественников хлорофилла (Хл) — протохлорофиллида, протопорфирина IX, Mg-протопорфирина IX и его монометилового эфира [3], которые при последующем освещении растений действуют как фотосенсибилизаторы, индуцируя развитие фотодинамических процессов. С другой стороны, имеющиеся в литературе данные указывают на то, что АЛК может также выполнять функции регулятора роста растений. В низких концентрациях (0,12—0,6 мМ) она оказывает стимулирующее действие на рост и урожайность ряда зерновых и овощных культур [4—6]. Ранее нами было показано, что повышение уровня АЛК в растениях на свету сопровождалось подавлением роста растений [7, 8]. Увеличение концентрации эндогенной АЛК в листьях ячменя достигалось путем обработки растений левулиновой кислотой (ЛК), которая является конкурентным ингибитором АЛК-дегидратазы — фермента, превращающего АЛК в порфобиллиноген. На основании того, что при этом не накапливались порфирины — фотосенсибилизаторы, было высказано предположение о том, что угнетение ростовых процессов не является следствием фотоповреждения клеточных мембран, а, скорее всего, сама АЛК или продукты ее непорфиринового метаболизма индуцировали торможение роста растений [7, 8]. Основываясь на литературных данных о разной утилизации атомов углерода молекулы АЛК в растительных объектах [9], а также о возможности использования продуктов катаболизма АЛК в синтезе пуринов в животных организмах [10, 11], авторы предложили гипотетическую схему катаболизма молекулы АЛК в растительной клетке. Согласно этой схеме, при наличии в растении высоких уровней АЛК часть субстрата, не вовлекаемая в образование порфиринов, превращается в первый продукт его катаболизма — диоксовалериановую кислоту, альдегидная группа которой затем используется в синтезе пуринов. Известно, что к числу производных пуринов относятся цитокинины (ЦК) [12]. Поступление продуктов катаболизма АЛК в цепь синтеза пуринов могло бы вызывать образование дополнительных количеств ЦК в растительной клетке, нарушение гормонального баланса в организме и угнетение вследствие этого ростовых процессов. Для того чтобы проверить предположение о возможности использования продуктов катаболизма АЛК в синтезе ЦК, в настоящей работе было проанализировано содержание природных ЦК, зеатина и его производных в растениях, накопивших избыточные количества АЛК.

**Материалы и методы исследования.** Для экспериментов использовались зеленые 5-дневные проростки ячменя (сорт Гонар), выращенные при температуре 22±2 °С в режиме 14 ч света / 10 ч темноты. Растения инкубировали корнями на 0,025 М растворе ЛК (рН 7,0) на свету в течение 17 ч. После чего корни тщательно промывали проточной водой, и растения

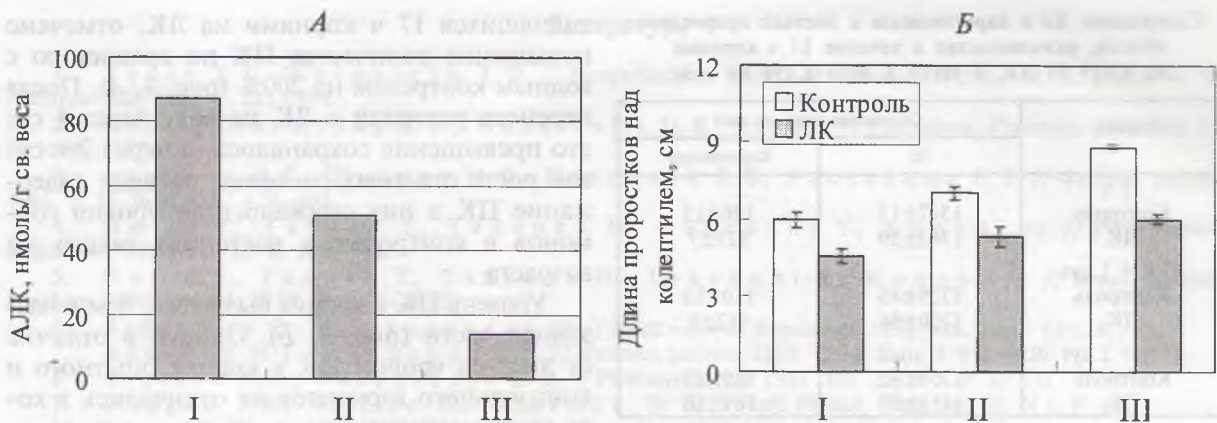


Рис. 1. Содержание АЛК в листьях (А) и длина проростков ячменя (Б), экспонированных 17 ч корнями на 0,025 М ЛК (I), а затем 1 (II) либо 2 (III) сут на воде. Представлены результаты одного типичного эксперимента. Содержание АЛК в контрольных необработанных ЛК растениях был ниже уровня детектирования

оставляли расти на воде еще в течение 2 сут на непрерывном свете. После 17 ч инкубации растений на растворе ЛК, а также через 1 и 2 сут их последующего роста на воде в контрольных (не подвергнутых обработке) и опытных растениях определяли содержание АЛК, Хл, каротиноидов и ЦК. Скорость ростовых процессов оценивали по изменению длины проростков над колеоптилем. В каждом эксперименте проводили измерение длины 100 проростков.

Количества АЛК определяли описанным в работе [13] способом. Содержание Хл и каротиноидов в водно-ацетоновых экстрактах листьев определяли спектрофотометрически (спектрофотометр UVIKON-931, Германия) [14].

Экстракцию ЦК проводили согласно работе [15]. Количество ЦК определяли с помощью иммуноферментного метода. Иммуноферментные наборы были получены из Института биологии Уфимского научного центра Российской Академии наук.

**Результаты и их обсуждение.** Полученные данные показывают, что экспонирование 5-дневных зеленых проростков ячменя корнями на 0,025М растворе ЛК на свету приводило к накоплению в листьях АЛК и угнетению роста растений, что согласуется с полученными ранее данными (рис. 1) [7, 8]. Содержание эндогенной АЛК, накапливаемой в листьях при выращивании растений в течение 17 ч на растворе ЛК, составляло 87—290 нмоль/г свежего веса в рамках 5 независимых экспериментов. На рис. 1 представлены данные единичного опыта. После переноса проростков с ЛК на воду уровень АЛК в листьях постепенно снижался, достигая через 2-е суток нулевых значений в отдельных экспериментах. Обнаружена прямая зависимость между степенью угнетения ростовых процессов и уровнем эндогенной АЛК в листьях (рис. 2).

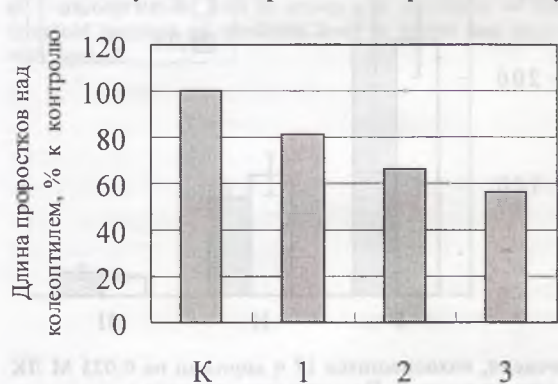


Рис. 2. Зависимость длины проростков ячменя от количества АЛК, накопившейся в листьях в течение 17 ч инкубации проростков на 0,025 М растворе ЛК. Представлены результаты 3 экспериментов. Содержание АЛК в листьях составляло 135, 170 и 290 нмоль/г св. веса в первом (1), втором (2) и третьем (3) экспериментах соответственно. На оси ординат представлена длина проростков через 2 сут после их переноса с ЛК на воду. За 100% принята длина контрольных проростков (К)

Как было показано ранее [7, 8], в листьях проростков ячменя, находившихся на растворе ЛК, не регистрировались порфириновые предшественники Хл. Содержание Хл и каротиноидов в опытных и контрольных растениях было практически одинаково. Только на 2-е сутки после переноса на воду в обработанных ЛК растениях уровень Хл несколько снижался (таблица), что можно объяснить редуцированным синтезом новых молекул пигмента в результате ингибирования превращения АЛК в порфирины.

Был проведен анализ содержания ЦК в листьях и корнях проростков ячменя, обработанных ЛК. Определено суммарное количество всех форм зеатина (нуклеотида, 9-N-глюкозида, рибозида и свободного основания зеатина) без их предварительного разделения. Максимальный уровень ЦК в листьях контрольных проростков детектировался в 6-дневном возрасте, после чего содержание фитогормона снижалось по мере старения растений. В листьях опытных проростков ячменя, на-

**Содержание Хл и каротиноидов в листьях проростков ячменя, находившихся в течение 17 ч корнями на 0,025 М ЛК, а затем 1 либо 2 сут на воде**

Вариант	Содержание, мкг/г св. веса	
	Хл	Каротиноиды
17 ч		
Контроль	1317±15	126±15
ЛК	1363±59	119±7
17 ч + 1 сут		
Контроль	1335±45	110±13
ЛК	1250±86	112±8
17 ч + 2 сут		
Контроль	1359±82	118±13
ЛК	1118±97	109±10

Примечание. Контрольные растения росли на воде. Представлены средние значения из 3 экспериментов.

Листья может быть обусловлено не поступлением фитогормонов из корней, а их синтезом непосредственно в надземной части, что согласуется с имеющимися в литературе сообщениями о том, что ЦК могут образовываться не только в корнях, но и в других органах растений, включая листья [16].

Таким образом, в листьях ячменя, содержащих избыточное количество эндогенной АЛК, наблюдалось повышение уровня ЦК, и эти проростки характеризовались подавлением ростовых процессов. Известно, что ЦК контролируют рост и развитие растений [17]. Характер ответной реакции организма в первую очередь зависит от концентрации фитогормона в клетке [18—20]. Наши данные согласуются с имеющимися в литературе сведениями о том, что даже не очень большое увеличение уровня ЦК в растениях может приводить к значительным морфологическим изменениям. Эти изменения, помимо слабо развитой корневой системы, уменьшенной листовой поверхности, увеличенного числа боковых побегов, включают и уменьшение высоты растений [21—23]. Это было хорошо продемонстрировано на трансгенных растениях табака и *Arabidopsis* с включенным в ядерный геном *ipt* геном, сшитым с индуцибельным промотором. *Ipt* ген кодирует изопентенилтрансферазу — фермент, катализирующий лимитирующую стадию в биосинтезе ЦК. Такие растения характеризовались повышенным уровнем эндогенных ЦК и подавлением ростовых процессов [22].

ходившихся 17 ч корнями на ЛК, отмечено повышение количества ЦК по сравнению с водным контролем на 200% (рис. 3, А). После переноса растений с ЛК на воду через 1 сут это превышение сохранялось, а через 2-е суток роста опытных растений на воде содержание ЦК в них снижалось до уровня гормонов в контрольных растениях такого же возраста.

Уровень ЦК в корнях был ниже, чем в надземной части (рис. 3, Б). Однако в отличие от листьев уровни ЦК в корнях опытного и контрольного вариантов не отличались в ходе всего эксперимента.

В условиях представленных выше опытов наблюдаемое повышение уровня ЦК в ли-

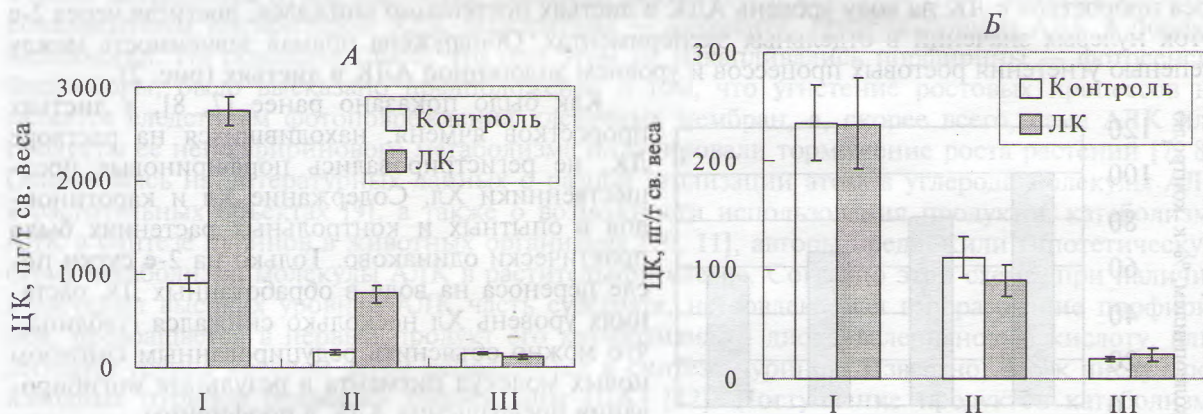


Рис. 3. Содержание ЦК в листьях (А) и корнях (Б) проростков ячменя, находившихся 17 ч корнями на 0,025 М ЛК (I), а затем 1 (II) либо 2 (III) сут на воде. Контрольные растения росли на воде. Представлены средние значения из 4 биологических повторностей и их стандартные ошибки

Полученные нами данные об увеличении уровня зеатина и его производных в листьях ячменя с повышенным содержанием АЛК подкрепляют выдвинутую ранее гипотезу о возможном использовании продуктов катаболизма молекул АЛК в синтезе ЦК. Несомненно, что для окончательного подтверждения этого предположения необходимы дополнительные эксперименты с использованием специфически меченой по пятому углеродному атому молекулы АЛК.

## Литература

1. Beale S. I., Weinstein J. D. // Biosynthesis of heme and chlorophylls / Ed. H. A. Dailey N. Y.: McGraw-Hill, 1990. P. 287—394.
2. Rebeiz C. A., Reddy K. N., Nandihalli U. B., Velu J. // Photochem. Photobiol. 1990. Vol. 52. P. 1099—1117.
3. Аверина Н. Г., Шалыго Н. В., Яронская Е. Б., Рассадина В. В. // Физиол. растен. 1988. Т. 35. Вып. 4. С. 679—686.
4. Hotta Y., Tanaka T., Такаока Н., Takeuchi Y., Konnai M. // Plant Growth Regulation. 1997. Vol. 22. P. 109—114.
5. Hotta Y., Tanaka T., Такаока Н., Takeuchi Y., Konnai M. // Biosci. Biotech. Biochem. 1997. Vol. 61, N 12. P. 2025—2028.
6. Bindu Roy C., Vivekanandan M. // Plant Growth Regulation. 1998. Vol. 26. P. 15—18.
7. Аверина Н. Г., Яронская Е. Б. // Физиол. растен. 1988. Т. 35. Вып. 5. 916—920.
8. Averina N. G., Yaronskaya E. B. // Photosynthetica. 1991. Vol. 25, N 1. P. 27—31.
9. Duggan J. K., Meller E., Gassman M. L. // Plant Physiol. 1982. Vol. 69, N 1. P. 19.
10. Shemin D., Russell C. S. // J. Amer. Chem. Soc. 1953. Vol. 75, N 18—19. P. 4873.
11. Nemeth A. M., Russell C. S. // J. Biol. Chem. 1957. Vol. 229, N 1. P. 415.
12. Mok D. W. S., Mok M. C. // Annu. Rev. Plant Mol. Biol. 2001. Vol. 52. P. 89—118.
13. Аверина Н. Г., Яронская Е. Б., Дудкина Т. С. // Физиол. и биохим. культ. растен. 1992. Т. 24, № 1. С. 54—59.
14. Шлык А. А. // Биохимические методы в физиологии растений. М., 1971.
15. 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. // Физиол. растен. 1990. Т. 37. Вып. 1. С. 193—199.
16. Singh S., Letham D. S., Palni L. M. S. // Physiol. Plant. 1992. Vol. 86. P. 398—406.
17. Howell S. H., Lall S., Che P. // TRENDS in Plant Science. 2003. Vol. 8, N 9. P. 453—459.
18. Werner T., Motyka V., Strnad M., Schmuelling N. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. Vol. 98, N 18. P. 10487—10492.
19. Catterou M., Dubois F., Smets R., Vaniet S., Kichey T., Onckelen H., Sangwan-Norreel B. S., Sangwan R. S. // Plant J. 2002. Vol. 30, N 3. P. 273—287.
20. Yang S. H., Yoh, Goh C. J. // Plant Molecular Biology. 2003. Vol. 51. P. 237—248.
21. Li Y., Hagen G., Guilfoyle T. J. // Developmental Biology. 1992. Vol. 153. P. 386—395.
22. Medford J. I., Horgan R., Zaki El—Sawi, Klee H. J. // The Plant Cell. 1989. Vol. 1. P. 403—413.
23. Smigocki Ann C. // Plant Molecular Biology. 1991. Vol. 16. P. 105—115.

YARONSKAYA E. B., VERSHILOVSKAYA I. V., AVERINA N. G.

### CONTENT OF ZEATIN AND ITS DERIVATIVES IN BARLEY (HORDEUM VULGARE L.) SEEDLINGS WITH INCREASED 5-AMINOLEVULINIC ACID LEVEL

#### Summary

Incubation of the barley seedlings with roots in levulinic acid solution in the light resulted in the excessive accumulation of 5-aminolevulinic acid in leaves and inhibition of the plant growth. The analysis of zeatin and its derivatives showed a threefold increase of cytokinin level in leaves and unchanged phytohormone content in roots of these seedlings compared with control.

Parameter	Control	Levulinic acid (1.5 mg/L)	Levulinic acid (6.11 mg/L)
Plant height (cm)	10.5	8.5	7.5
Chlorophyll content (SPAD)	25	22	20
5-Aminolevulinic acid (µg/g)	1.0	3.0	3.0
Zearalenone (µg/g)	0.5	0.5	0.5
Zearalenone derivatives (µg/g)	0.5	0.5	0.5
Cytokinin (µg/g)	1.0	3.0	3.0